

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Caractérisation de l'histidine kinase PdhS et de son implication dans l'asymétrie de *Brucella abortus*

Hallez, Régis

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Facultés Universitaires
Notre-Dame de la Paix**



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Caractérisation de l'histidine kinase essentielle PdhS et de son implication dans l'asymétrie de *Brucella abortus*

**Dissertation présentée par
Régis Hallez
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences**

Composition du jury :

Pr. J. Vandenhoute (Promoteur, FUNDP, Namur)
Pr. X. De Bolle (Co-promoteur, FUNDP, Namur)
Dr. J-Y. Matroule (FUNDP, Namur)
Pr. L. Van Melderen (ULB, Bruxelles)
Dr. D. O'Callaghan (INSRM, Nîmes)

2007

RESUME

Les α -protéobactéries rassemblent des genres qui présentent des styles de vie très diversifiés. Malgré ces différences, ces genres bactériens partagent plusieurs points communs, notamment une division asymétrique. En effet, au moins quatre espèces d' α -protéobactéries se divisent de manière asymétrique, en générant deux cellules filles de taille différente. Cette asymétrie morphologique est associée à une asymétrie fonctionnelle chez l'organisme modèle *Caulobacter crescentus*, puisque la petite cellule est flagellée et mobile alors que la plus grande est pédonculée et fixée au substrat. De plus, cette asymétrie précède des événements de différenciation, dès lors que la petite cellule flagellée se différencie en grande cellule pédonculée. Un réseau complexe de transduction du signal à plusieurs composants, centré essentiellement sur les deux régulateurs essentiels DivK et CtrA, est impliqué dans le contrôle et la coordination d'événements liés au cycle cellulaire et au développement. Ce réseau de régulation semble également être conservé au sein des α -protéobactéries. Nous avons donc émis l'hypothèse que la division asymétrique et la différenciation qui lui est associée sont conservées au sein du groupe diversifié des α -protéobactéries, et que ces mécanismes sont placés sous le contrôle du réseau de régulation dépendant de DivK et CtrA. Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi la bactérie pathogène *Brucella abortus* comme modèle d'étude. Cette bactérie se divise de manière asymétrique et comporte une histidine kinase (HK) supplémentaire par rapport à *C. crescentus*, appelée PdhS, probablement impliquée dans le contrôle de DivK et CtrA. La caractérisation fonctionnelle de cette HK nous a permis de démontrer que le gène *pdhS* est essentiel à la viabilité de *B. abortus*, et que la protéine PdhS est distribuée asymétriquement au sein de *B. abortus*. Cette asymétrie moléculaire nous a également permis d'observer que *B. abortus* se différencie à l'instar de *C. crescentus*. Enfin, la distribution asymétrique de PdhS au sein d'autres espèces d' α -protéobactéries nous a permis de proposer que la division asymétrique et la différenciation bactériennes pourraient être des caractéristiques communes aux α -protéobactéries.

SUMMARY

The α -proteobacteria are composed of genera which display very diversified lifestyles. Despite these differences, these bacterial genera share some common points, notably an asymmetric division. Indeed, at least four different α -proteobacterial species divide asymmetrically, by generating two daughter cells of different size. This morphological asymmetry is associated with a functional asymmetry in the model organism *Caulobacter crescentus*, since the small cell is flagellated and motile while the bigger one is stalked and sessile. Moreover, this asymmetry precedes differentiation events since the small swarmer cell differentiates into the bigger stalked cell. A complex signal transduction network, centered on the essential regulators DivK and CtrA, is involved in the control and coordination of cell cycle and developmental events. This regulatory network seems to be also conserved among the α -proteobacteria. We have therefore proposed the hypothesis that the asymmetric division and the differentiation which is associated to it are conserved among the diversified α -proteobacterial group, and that these mechanisms are under the control of the DivK- and CtrA-dependent regulatory network. To test this hypothesis, we chose to work with the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. This bacterium divides asymmetrically and possesses a supplementary histidine kinase (HK) in comparison with *C. crescentus*, called PdhS, which is probably implicated into the control of DivK and CtrA. The functional characterization of this HK allowed us to demonstrate that the *pdhS* gene is essential for viability in *B. abortus*, and that the PdhS protein is asymmetrically distributed into *B. abortus*. This molecular asymmetry also allowed us to observe that *B. abortus* displays a differentiation event like *C. crescentus*. Finally, the asymmetric distribution of PdhS into other α -proteobacteria allowed us to propose that the bacterial asymmetric division and differentiation could be a common characteristic of α -proteobacteria.

REMERCIEMENTS

On me reproche souvent d'être trop descriptif, de manquer d'esprit de synthèse. C'est pourquoi je ferai simple en remerciant toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à l'accomplissement de cette thèse.

C'est peut-être un peu trop condensé sous cette forme ? Détaillons un peu. Le naturel revient au galop...

Commençons par le haut de la pyramide. Je tiens à remercier les membres du jury pour leur lecture, leurs conseils et leurs remarques judicieuses concernant ma thèse.

Un merci tout particulier aux chefs de l'URBM qui ont chacun joué un rôle essentiel dans mon parcours. Tout d'abord Jean-Jacques sans qui je n'aurais jamais approché une bactérie de ma vie. Lorsque je suis arrivé à Namur pour effectuer mes études de Biologie, j'étais voué, du moins je le pensais, à une carrière d'écologiste, défenseur de la planète et de la vie animale qu'elle héberge. C'était évidemment sans compter l'intervention de Jean-Jacques qui dès son premier cours de Microbiologie m'a transmis cette PASSION dévorante pour les bactéries. C'est donc logiquement après quelques heures suivies du cours de Microbiologie que mon destin professionnel s'est décidé. Oui mais que faire en Microbiologie. Les possibilités sont tellement nombreuses qu'il fallait choisir. C'est à cet instant que l'intervention Monsieur Vandenhoute s'est révélée décisive. En effet, j'ai très vite compris que la Génétique me donnerait le moyen de répondre aux questions qui occupaient mon esprit. Et qui me passionnaient. Une fois ces décisions prises, il ne me restait plus qu'à trouver un soutien moral et amical que j'ai très rapidement trouvé auprès de l'éminent professeur Xavier De Bolle. Un énorme merci à toi Xavier pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces six belles années de Sciences. Merci pour tes conseils, ton soutien, ta confiance aveugle en mes idées parfois un peu saugrenues et ton amitié.

Un merci tout particulier à Christine pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire et m'avoir tant conseillé sur mon travail.

Après les chefs, les collègues. Je ne prendrai pas le risque de tous vous énumérer de peur d'oublier quelqu'un. Merci à vous tous, pour tous ces moments, professionnels et amicaux, que j'ai eu la chance de connaître. La complicité que j'ai partagée avec chacun d'entre vous a rendu mon départ difficile.

Je tiens également à remercier les nombreux étudiants dont j'ai eu la responsabilité à un moment ou un autre de ma thèse. Un merci tout particulier à Johann qui non seulement m'a été d'une aide professionnelle et amicale plus qu'appréciable et mais également a repris, sans surprise, le flambeau du sujet CtrA. Je te souhaite autant de bonnes choses que celles que j'ai eu la chance de vivre.

Merci également à mes nouveaux collègues et à mon nouveau chef(e) pour m'avoir accueilli et accepté en tant que pré-post-doc dans leur laboratoire. Attention les gars, le préfixe pré va bientôt sauter ;-)

J'aimerais également remercier mes parents pour m'avoir permis de réaliser un de mes rêves. Je ne me serais jamais découvert cette passion sans votre soutien et votre confiance aveugle.

And the last but not the least, merci à mes deux amours. Tout d'abord Kathalyn. Je sais que mon travail a souvent empiété sur notre vie et que tu n'as jamais vraiment compris comment un travail, aussi passionnant soit-il, pouvait prendre autant de place dans ma petite tête. A un tel point que tu en es parfois arrivée à détester ces pauvres bactéries. Mais malgré cela, tu as toujours accepté ma passion, en me soutenant dans les moments un peu plus difficiles. Merci donc pour tout ce que tu as fait, ou n'as pas fait, et pour tout ce que tu es. Ensuite, mon petit bonhomme, Noé. Il est vrai que tu es arrivé à la fin de ma thèse et que tu n'as pas vraiment connu les moments passés dans le labo à Namur. Il n'empêche que ta présence m'a été d'une aide précieuse, entre autres choses pour l'achèvement de ma thèse. Il me suffit de voir un de tes sourires magiques pour me motiver et pour embellir une journée difficile. J'espère secrètement pouvoir un jour te faire partager ma passion des bactéries, au grand damne de ta maman...

En guise de conclusion, je vous dirai à tous :

A 3D rendered graphic of the text "Many thanks to everybody!". The letters are white with a slight shadow and are arranged in a perspective view, giving them a three-dimensional appearance as if they are standing on a surface.

ABREVIATIONS

Aa :	acide aminé
ADN :	acide désoxyribonucléique
Ala :	alanine
Asp :	aspartate
BCV	<i>Brucella</i> containing vacuole
bp:	base pair
CDS :	coding sequence
CFP :	cyan fluorescent protein
eGFP:	enhanced green fluorescent protein
GFP :	green fluorescent protein
His :	histidine
HK :	histidine kinase
Hpt :	histidine phosphotransferase
kb:	kilobase
kDa :	kilodalton
Mb :	megabase
ORF :	open reading frame
PBP :	penicillin binding protein
PCR :	polymerase chain reaction
RR :	response regulator
Tyr :	tyrosine
YFP :	yellow fluorescent protein

INTRODUCTION	1
I. Importance de la différenciation chez l'être vivant	1
II. Les α-protéobactéries, un groupe hétérogène	2
III. Division asymétrique et différenciation chez les bactéries	3
1. Division bactérienne	3
1.1. Fission binaire, le cas de <i>E. coli</i>	3
1.1.1. Identification des gènes de division cellulaire	3
1.1.2. Sélection du site de division cellulaire	4
A. Le « Nucleoid Occlusion »	4
B. Le système Min	5
C. Redondance des deux systèmes	6
1.1.3. Assemblage de l'appareil cytoplasmique	7
A. L'anneau Z, pièce maîtresse de la division bactérienne	7
B. A après Z	8
1.1.4. Ancrage en membrane grâce à ZipA	8
1.1.5. Machinerie de synthèse du peptidoglycan septal et protéines associées	9
A. La PBP-3 FtsI	9
B. Constriction, fermeture du septum et naissance des nouveaux pôles	9
1.2. Asymétrie dans la symétrie	10
1.3. Division asymétrique, les cas de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Caulobacter crescentus</i>	12
1.3.1. Spécificités de la division chez 3 espèces bactériennes modèles	12
1.3.2. Spores issues d'une division asymétrique chez <i>B. subtilis</i>	13
1.3.3. <i>C. crescentus</i> : une grande pour s'attacher et une petite pour nager	14
2. Différenciation bactérienne	15
2.1. La sporulation	15
2.1.1. Initiation de la sporulation	16
2.1.2. Ségrégation du chromosome dans la préspore	16
2.1.3. Induction de la transcription cellule-spécifique	17
2.2. La double vie de <i>C. crescentus</i>	19
2.2.1. Interdépendance et checkpoints entre processus cellulaires et développementaux	20
2.2.2. L'initiation de la réplication d'ADN	21
A. Le régulateur de réponse CtrA	21
B. Le régulateur global GcrA	22
C. Le tmRNA SsrA	22
2.2.3. La chorégraphie des chromosomes néo-synthétisés	23
2.2.4. Différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée	23
3. Importance des systèmes à deux composants dans la régulation de la différenciation bactérienne	24
3.1. Les deux composants en question	24
3.2. Sporule-sporule pas, voie de phosphorylation menant à la sporulation chez <i>B. subtilis</i>	25
3.2.1. Le régulon de Spo0A chez <i>B. subtilis</i> , un régulateur de réponse central	25
3.2.2. Les mécanismes contrôlant l'activité de Spo0A	26
A. Le phosphorelais à plusieurs composants en amont de Spo0A	26
B. Contrôle transcriptionnel de spo0A et de gènes impliqués dans le phosphorelais de Spo0A	28
3.3. Nage-nage pas, les phosphorelais contrôlant la mobilité et la synthèse du pédoncule de <i>C. crescentus</i>	28
3.3.1. Le régulon de CtrA chez <i>C. crescentus</i> , un régulateur de réponse global	28
3.3.2. Les multiples mécanismes contrôlant CtrA dans l'espace et dans le temps	29
A. La transcription de ctrA	30
B. La protéolyse de CtrA	30
C. La phosphorylation de CtrA	32
4. « Morphological and functional asymmetry in α -Proteobacteria »	39
OBJECTIFS DU TRAVAIL	45
RESULTATS	46
« The Asymmetric Distribution of the Essential Histidine Kinase PdhS Indicates a Differentiation Event in <i>Brucella abortus</i> »	46

DISCUSSION GENERALE	78
ANNEXES	80
I. « Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in Brucella abortus »	80
II. Matériels et Méthodes supplémentaires	87
Clonage Gateway	87
Amplification PCR	87
Réaction BP	87
Réaction LR	87
Préparation échantillons pour la microscopie à fluorescence	88
BIBLIOGRAPHIE	89

INTRODUCTION

I. Importance de la différenciation chez l'être vivant

La différenciation cellulaire est un processus biologique qui conduit irréversiblement à la spécialisation des cellules, et est dès lors essentielle à la formation des tissus et des organes chez les organismes eucaryotes supérieurs. La différenciation permet aux cellules d'acquérir leurs propriétés spécifiques (par exemple la capacité à transmettre l'influx nerveux pour les neurones, à se contracter pour les cellules musculaires, à produire du lait pour les cellules de la glande mammaire). En effet, toutes les cellules d'un organisme sain sont issues d'une seule et même cellule, et sont dès lors, à quelques exceptions près, identiques d'un point de vue génétique mais n'expriment pas pour autant les mêmes phénotypes. Par exemple, le génome humain comprend environ 30000 gènes, mais une cellule n'en exprime qu'une dizaine de milliers. Cette expression différentielle de gènes mène à terme à la différenciation cellulaire. La portion de gènes exprimés dans un type cellulaire dépend essentiellement de l'origine embryonnaire des cellules en question, du stade de développement de l'organisme, de l'environnement dans lequel se trouve le tissu ou encore de la cellule elle-même. La différenciation cellulaire est donc en rapport direct avec les gènes dont les fonctions sont de réprimer ou d'activer l'expression d'autres gènes. L'activation ou la répression de l'expression de ces gènes sera régulée temporellement et spatialement au sein de la cellule en question. Ce contrôle temporel et spatial dépend souvent de la localisation subcellulaire des régulateurs en question. Il existe une relation entre la localisation subcellulaire de régulateurs et l'induction de la différenciation cellulaire. Le caractère irréversible de la différenciation démarque celle-ci de l'adaptation que peut développer une cellule, un tissu, un organe ou un organisme face à des changements de l'environnement. Dans le cas d'une adaptation, les changements seront réversibles, et ne serviront qu'à pallier aux fluctuations passagères de l'environnement. D'une manière générale, il existe un certain antagonisme entre différenciation cellulaire et multiplication cellulaire, même si cette relation n'est pas exclusive. En d'autres termes, lorsqu'une cellule entre en différenciation, la division de celle-ci sera temporairement inhibée.

II. Les α -protéobactéries, un groupe hétérogène

Les α -protéobactéries constituent une sous-classe des protéobactéries qui rassemble, sur base des séquences de l'ARN ribosomal 16S, des bactéries aux mœurs et habitats extrêmement diversifiés. On y retrouve aussi bien des bactéries libres telles que *C. crescentus* ou *Rhodopseudomonas palustris*, que des bactéries symbiontes de plantes (*Rhizobium* spp.), ou encore des pathogènes de plantes (*Agrobacterium* spp.), d'animaux (*Brucella* spp.) ou humains (*Bartonella* spp., *Rickettsia prowazekii*). A côté des séquences conservées de l'ARN ribosomal 16S, les représentants de ce groupe pourraient, tous ou en partie, contenir des voies de régulation conservées, ou plus simplement des régulateurs conservés. C'est par exemple le cas du RR CtrA qui est présent chez plusieurs espèces d' α -protéobactéries (Bellefontaine et al., 2002; Hallez et al., 2004; McAdams et al., 2004). En outre, une forme ancestrale de division asymétrique pourrait bien avoir été conservée au cours de l'évolution chez ce groupe de bactéries, dès lors qu'au moins 4 espèces se divisent de manière asymétrique (Hallez et al., 2004; Lam et al., 2003). C'est précisément l'étude de la division asymétrique d'une α -protéobactérie, en l'occurrence *Brucella abortus*, qui a fait l'objet de cette thèse.

Les bactéries du genre *Brucella* sont de petit coccobacilles à Gram négatif d'une taille approximative de 1 μm sur 0,5 μm . Ce groupe est classiquement divisé en six espèces en fonction de traits phénotypiques et de spécificité d'hôte ; *B. melitensis* pour les capridés, *B. abortus* pour les bovidés, *B. suis* pour les suidés, *B. canis* pour les canidés, *B. ovis* pour les ovidés et *B. neotomae* pour le rat du désert. Deux nouvelles espèces ont récemment été identifiées chez les mammifères marins, *B. cetaceae* et *B. pinnipidae* (Cloeckaert et al., 2001). Le génome de trois espèces (*B. melitensis*, *B. suis* et *B. abortus*) a complètement été séquencé (DelVecchio et al., 2002; Halling et al., 2005; Paulsen et al., 2002). Le génome de ces 3 espèces est porté sur 2 chromosomes, l'un compte 2,3 millions de paires de bases (Mb) et l'autre 1,2 Mb, ce qui équivaut à environ 3200 séquences codantes prédites pour l'ensemble du génome. Les protéines conservées au sein des 3 espèces présentent plus de 99% d'identité. De même, il n'existe que très peu de différences génomiques entre ces 3 espèces, la plus importante étant peut-être l'absence d'un fragment d'environ 25 kb du génome de *B. abortus* (Halling et al., 2005). Ce dernier encode des protéines apparemment impliquées dans la synthèse de polysaccharides. *Brucella* spp. est une bactérie pathogène intracellulaire dite facultative, et responsable d'une maladie appelée brucellose chez les animaux et fièvre de Malte chez l'homme. Les détails moléculaires du cycle infectieux de *Brucella* sont encore mal connus. *Brucella* infecte l'organisme en colonisant des cellules phagocytaires professionnelles ou non-professionnelles et en les utilisant non seulement comme niche de réplication mais également comme véhicule de transport. Cette réplication intracellulaire au sein de phagocytes est une étape primordiale de l'infection de *Brucella* (Gorvel and Moreno, 2002). La première étape de cette invasion consiste pour *Brucella* à éviter la fusion phagolysosomiale. Ensuite la vacuole contenant *Brucella* spp. (BCV) va maturer en acquérant une série de marqueurs qui diffèrent suivant le type cellulaire et l'activation de la cellule hôte, pour finalement s'installer dans une vacuole de réplication, souvent caractérisée par la présence de protéines du réticulum endoplasmique (Pizarro-Cerda et al., 1998; Pizarro-Cerda et al., 2000).

III. Division asymétrique et différenciation chez les bactéries

1. Division bactérienne

La division cellulaire est évidemment un processus essentiel chez les êtres vivants. Chez les bactéries, elle implique notamment la partition du cytoplasme en deux compartiments, chacun comportant au moins une copie du matériel génétique. Chez les bactéries à Gram-négatif, l'évènement de division, également appelé septation ou constriction, implique l'invagination circonférentielle des trois couches de l'enveloppe cellulaire entre les chromosomes ségrégués.

La division bactérienne a particulièrement bien été caractérisée chez la bactérie modèle *Escherichia coli*, qui présente une division équatoriale symétrique, également appelée fission binaire que l'on retrouve chez la plupart des bactéries à Gram-négatifs. Ce processus cellulaire peut être subdivisé en quatre étapes majeures : (i) la sélection du site de division, habituellement le centre équatorial de la bactérie entre les nucléoïdes (définissant les chromosomes bactériens condensés) nouvellement répliqués et séparés, comme c'est le cas pour *E. coli*, (ii) l'assemblage de l'appareil cytoplasmique incluant notamment la protéine FtsZ formant un anneau appelé anneau Z, (iii) le recrutement d'une ou de plusieurs protéines permettant un lien à la membrane cellulaire et éventuellement aux différentes couches de l'enveloppe bactérienne, (iv) et finalement l'assemblage de protéines possédant des domaines majeurs extracellulaires, plus particulièrement les « penicillin binding proteins » (PBPs) qui dirigent la synthèse de la paroi et d'autres couches de l'enveloppe bactérienne au site de division et qui donnera naissance aux nouveaux pôles (issus d'un évènement récent de division). Cette dernière étape sera également accompagnée d'une constriction et d'étapes nécessaires à la fermeture du septum et à la maturation des nouveaux pôles ainsi formés.

1.1. Fission binaire, le cas de *E. coli*

Cette partie de l'introduction s'inspire principalement des références suivantes : (Errington et al., 2003; Lutkenhaus and Mukherjee, 1996; Rothfield et al., 2005; Weiss, 2004)

1.1.1. Identification des gènes de division cellulaire

La plupart de gènes impliqués dans le processus de division cellulaire chez *E. coli* ont été identifiés grâce à des cribles génétiques sur base d'un phénotype relativement simple. En effet, ces cribles consistaient à isoler des mutants conditionnels incapables de croître à haute ou basse température, mutants dits thermo- ou cryo-sensibles, respectivement. Ces mêmes mutants ont alors été triés en fonction de leurs phénotypes morphologiques, à savoir la formation de bactéries filamenteuses à température restrictive. Ce critère était en effet basé sur l'idée qu'un mutant incapable de se diviser allait former un filament suite à la croissance continue de la masse cellulaire en absence de division. Les mutants ainsi identifiés ont finalement été classés comme ayant soit un défaut primaire de ségrégation d'ADN chromosomique (mutants *par* pour partition) ou de septation (mutants *fts* pour filamentation sensible à la température). La principale différence phénotypique entre ces deux classes de mutants se situe au niveau de la distribution de l'ADN chromosomique. Les mutants défectifs pour la partition (*par*) présentent d'une grande quantité d'ADN au centre du filament ou des masses d'ADN distribuées aléatoirement au sein du filament. De ce fait, les gènes *par* regroupent entre autres des gènes de répllication d'ADN et de topologie d'ADN indispensables à la bonne séparation et partition des chromosomes nouvellement répliqués. Les mutants *fts* présentent au contraire une morphologie filamenteuse avec des nucléoïdes

distribués de manière régulière au sein du filament. De plus, les mutants *fts* peuvent être divisés en sous-catégories en fonction de la filamentation observée. Par exemple, un mutant impliqué dans les étapes précoces de la division bactérienne donnera une filamentation « lisse », c'est-à-dire sans la moindre trace d'initiation de septation, alors qu'un mutant de gènes plus tardifs montrera des signes de constriction avortée, et enfin une mutation dans un gène codant une protéine impliquée dans les étapes de séparation des cellules filles présentera une filamentation sous la forme de chaînettes au sein desquelles on peut distinguer les cellules filles aboutées les unes aux autres. Ces derniers critères ont permis d'identifier une dizaine de gènes essentiels impliqués directement dans une des 3 dernières étapes de la division bactérienne.

1.1.2. Sélection du site de division cellulaire

Avant de passer brièvement en revue les rôles biologiques assurés par les protéines de division cellulaire identifiées grâce à des cribles génétiques, illustrons les deux mécanismes moléculaires identifiés à ce jour, nécessaires à la sélection du site de division cellulaire. Un des problèmes ayant occupé les scientifiques intéressés par la division bactérienne était de comprendre comment le processus de division se déroulait, parfaitement dans le temps et dans l'espace, au centre d'une bactérie comme *E. coli*. Cette question est en partie élucidée grâce à la découverte et à la caractérisation des deux mécanismes impliqués dans la sélection du site de division cellulaire, le « Nucleoid Occlusion » et le système Min.

A. Le « Nucleoid Occlusion »

Ce mécanisme tire son nom d'observations faites dans les années 1980. Le groupe de Woldringh (Mulder and Woldringh, 1989) avait en effet observé que l'évènement de division cellulaire est fortement inhibé à proximité des nucléoïdes de cellules au sein desquelles la réplication d'ADN et/ou la ségrégation était perturbé. Au sein des bactéries de morphologie normale, il existe 3 sites où l'ADN chromosomique est absent ou très faiblement concentré. L'un se situe au centre équatorial (entre les chromosomes récemment dupliqués), les deux autres se trouvent aux pôles. Sachant que la division des bactéries sauvages d'*E. coli* se déroule toujours au centre équatorial, cela suggère que ces mêmes bactéries ont développé un mécanisme moléculaire capable de sentir l'absence ou la faible concentration d'ADN chromosomique au sein de la bactérie, et plus spécifiquement à ce site. Récemment, deux protéines ont été identifiées comme ayant un rôle prépondérant dans le phénomène de « Nucleoid Occlusion ». Il s'agit de Noc chez la bactérie à Gram-positif *Bacillus subtilis* (Wu and Errington, 2004) et SlmA chez *E. coli* (Bernhardt and de Boer, 2005). Ces deux protéines, bien que ne présentant pas de similarité de séquence, fonctionnent de manière similaire et partagent plusieurs caractéristiques communes. Parmi celles-ci, citons la capacité de ces deux protéines à se localiser sur le nucléoïde tout en inhibant la formation de l'anneau Z (Figure 1), étape indispensable dans l'initiation de la septation (voir plus bas). Ces deux protéines sont capables d'interagir physiquement avec FtsZ, composant exclusif de l'anneau Z en question. De par ces caractéristiques, SlmA et Noc ont la capacité d'inhiber la division à proximité du nucléoïde, en conséquence de quoi la surexpression de ces acteurs dans leur espèce bactérienne respective mène au phénotype typique d'une inhibition de division cellulaire, à savoir l'apparition de bactéries filamenteuses.

Etant donné que la zone centrale dépourvue d'ADN est générée en fin de chaque cycle de réplication d'ADN (après condensation et séparation des chromosomes dupliqués), ce mécanisme de « Nucleoid Occlusion » fournit non seulement un signal spatial mais également un signal temporel pour l'évènement de division.

Il reste cependant un problème que ne peut expliquer le phénomène de « Nucleoid Occlusion », à savoir qu'il existe deux autres sites que celui situé au centre équatorial d'une bactérie comme *E. coli* qui présente une faible concentration en ADN chromosomique. Il s'agit des pôles bactériens, situés comme leur nom l'indique aux extrémités du cylindre représentant une cellule d'*E. coli* (Figure 1). C'est précisément pour éviter que la division ne s'effectue à ces pôles que les bactéries ont développé un second système moléculaire, le système Min.

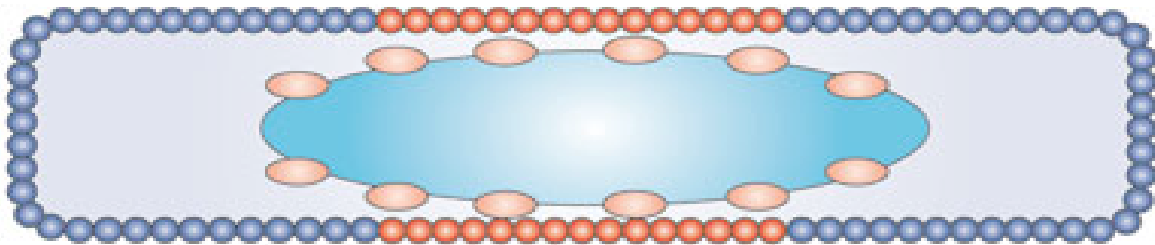


Figure 1: Principe du "Nucleoid Occlusion" (NO). Le nucléoïde, représenté en bleu ciel, est recouvert des protéines effectrices du NO (SImA ou Noc chez *E. coli* ou *B. subtilis*, respectivement) qui engendrent une inhibition de la division bactérienne sur une région encerclant le nucléoïde (représentée en rouge). Issu de (Rothfield et al., 2005).

B. Le système Min

Le nom que porte ce système provient de l'observation microscopique de mutants d'*E. coli* générant des « minicells » il y a une quarantaine d'années (Adler et al., 1967). Ces « minicells », issus d'événements de division cellulaire initiés près des pôles, sont de petites cellules sphériques dépourvues d'ADN chromosomique. La recherche des gènes mutés donnant ce phénotype caractéristique de « minicells » a mené à l'identification d'un opéron (*minB*) composé de 3 ORFs, *minCDE* (de Boer et al., 1989).

MinC constitue l'inhibiteur de division de ce système puisqu'il interagit avec FtsZ et inhibe de ce fait la formation de l'anneau Z. MinE est le facteur de spécificité topologique. En d'autres termes, il restreint l'activité inhibitrice de MinC aux pôles en neutralisant son effet au centre équatorial (Figure 2). Enfin MinD est la protéine d'assemblage en membrane du système puisqu'elle permet à MinC et MinE d'être associés à la membrane (Figure 2). En résumé, les complexes MinCD inhibent la division bactérienne (en empêchant la formation de l'anneau Z) à tout endroit de la bactérie excepté là où se trouve le complexe MinDE, à savoir au centre équatorial (Figure 2).

L'utilisation de versions taggées des protéines MinC, D ou E (fusions traductionnelles à la protéine fluorescente GFP ou une de ces dérivées) a permis d'étudier leur distribution subcellulaire au sein de bactéries vivantes et au cours du temps (Raskin and de Boer, 1997; Raskin and de Boer, 1999a; Raskin and de Boer, 1999b). Ces observations microscopiques ont mis en évidence le caractère dynamique du système Min chez *E. coli*. En effet, le complexe MinCD responsable de l'inhibition de la division oscille de manière régulière d'un pôle à l'autre de la bactérie. Cette oscillation dépend de la présence de MinE. Brièvement, le complexe MinCD s'associe à un pôle de la bactérie sous la forme d'un arc suivant la courbure du pôle (Figure 2). MinE quant à lui forme un anneau (appelé anneau E) au centre équatorial et se dirigeant vers le pôle occupé par MinCD. L'anneau E va alors désintégrer la structure polaire MinCD en se dirigeant vers le pôle en question. Les protéines MinCD vont alors s'associer au pôle opposé, pôle vers lequel l'anneau E se dirigera de manière à désintégrer les nouveaux complexes MinCD, et ainsi de suite. L'oscillation d'un pôle à l'autre des complexes MinCD présente une période de 1 à 2 minutes par cycle et dès lors intervient au moins une

dizaine de fois à chaque cycle cellulaire de *E. coli* (équivalent à 20 minutes). La résultante globale de ce mécanisme oscillant est que la concentration des complexes inhibant la division (complexe MinCD) est maximale aux pôles et minimale au centre équatorial. Ce mécanisme assure donc à la division bactérienne de se dérouler préférentiellement au pôle équatorial de *E. coli*.

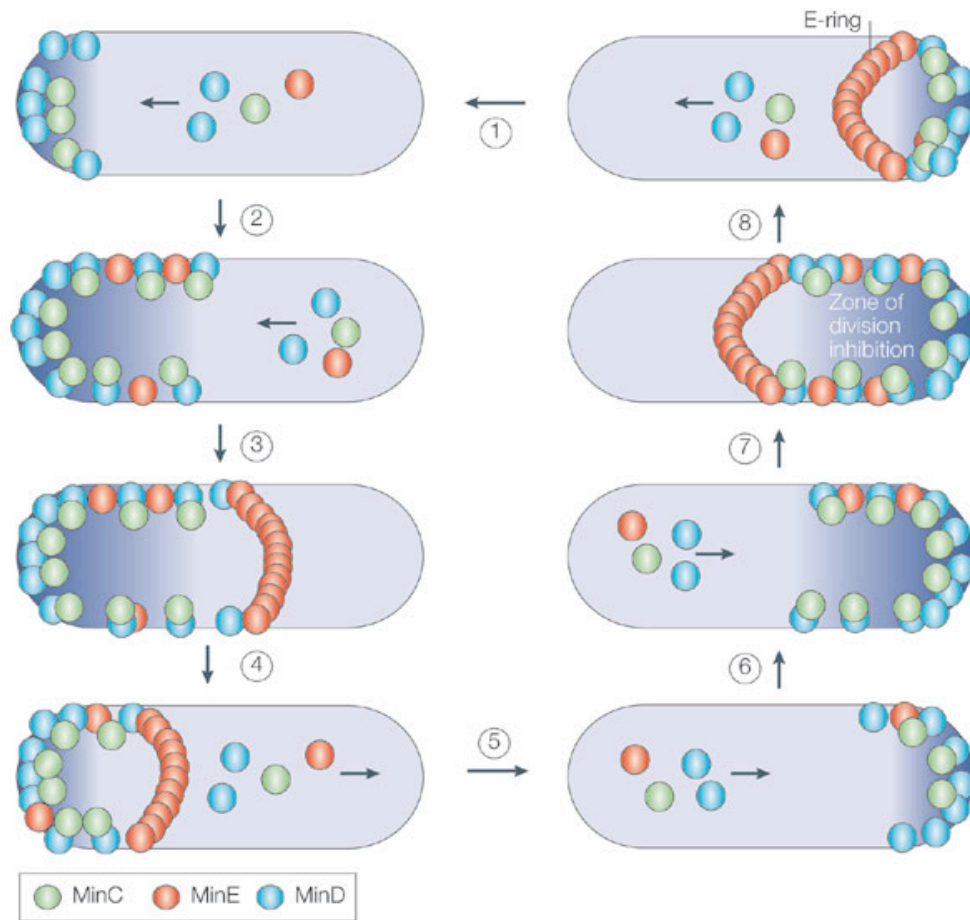


Figure 2: Oscillation d'un pôle à l'autre des complexes MinCDE chez *E. coli*. La zone polaire MinCDE (gauche) croît en direction du centre cellulaire (1-2). L'anneau E s'assemble à l'extrémité de la zone polaire (3). Les molécules de MinC, MinD et MinE se désassemblent des complexes pour coloniser l'autre pôle (4-5). Les mêmes événements se déroulent alors à l'autre pôle (droite, 6-8). La résultante globale de ce cycle est une concentration élevée en inhibiteur de la division cellulaire MinC aux régions polaires (représenté en bleu foncé). Issu de (Rothfield et al., 2005).

C. Redondance des deux systèmes

La finalité des deux systèmes présentés ci-dessus étant similaire, à savoir l'inhibition de la division bactérienne aux sites autres que le centre équatorial, nous pourrions nous demander pourquoi des bactéries comme *E. coli* ont conservé deux mécanismes aussi complexes pour une même tâche. Wu et Errington (2004) ont émis l'hypothèse que le phénomène de « Nucleoid Occlusion » avait une importance prépondérante en cas de problèmes liés au nucléoïde (inhibition de la réplication d'ADN, mauvaise séparation et/ou ségrégation des chromosomes nouvellement dupliqués, ...). En effet, en présence de telles perturbations, les cellules apparaissent comme des filaments éloignant progressivement les

deux pôles d'une même bactérie. Dans cette configuration, la gamme de concentration des systèmes d'inhibition de la division (complexe MinCD) est bien plus étendue et moins efficace puisqu'elle pourrait permettre la formation d'un anneau de division entre la position centrale et un des pôles. Etant donné que le ou les nucléoïdes occupent ces positions intermédiaires, le phénomène de « Nucleoid Occlusion » empêche la formation d'un anneau de division à un endroit inapproprié et dès lors empêche de « tronçonner » un nucléoïde. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les systèmes Min et de « Nucleoid Occlusion » sont à eux seuls dispensables puisque les simples mutants *min*- et *slmA*- ou *noc*- sont parfaitement viables, alors que les doubles mutants (*min*-/*slmA*- ou *min*-/*noc*-) sont létaux. C'est d'ailleurs grâce à cette caractéristique que le groupe de de Boer a eu l'ingéniosité de développer un crible de mutants synthétiques létaux ayant mené à l'identification du gène *slmA* (Bernhardt and de Boer, 2005). En conclusion, les systèmes Min et de « Nucleoid Occlusion » sont en effet redondants mais parfaitement complémentaires en cas de stress rencontrés par *E. coli*.

1.1.3. Assemblage de l'appareil cytoplasmique

A. L'anneau Z, pièce maîtresse de la division bactérienne

FtsZ est considéré comme l'acteur central de la division bactérienne et ce à différents égards. Premièrement, c'est la protéine de division la plus répandue dans le monde vivant puisqu'elle est virtuellement présente chez toutes les eubactéries, la plupart des archéobactéries ainsi que dans les organelles de beaucoup de cellules eucaryotes. En outre, FtsZ est au sommet de la hiérarchie d'assemblage de toutes les protéines de division bactériennes identifiées à ce jour. Cela signifie que n'importe quelle protéine de division nécessite la présence de FtsZ pour accomplir ses fonctions. Enfin, les mutants conditionnels *ftsZ* sont les seuls à générer des bactéries filamenteuses sans la moindre trace d'initiation de constriction, contrairement aux mutants d'autres gènes de division bactérienne qui la plupart du temps montrent des signes discrets de constriction. Cette dernière remarque suggère que FtsZ est la première protéine requise pour l'initiation de la division bactérienne. Cette protéine s'assemble en présence de GTP en une structure annulaire au centre équatorial de la bactérie (de Boer et al., 1992) (Figure 3). Cet anneau Z peut *in vivo* s'assembler et se désassembler très rapidement (de l'ordre de 1 à 3 minutes pour l'assemblage et de 1 minute pour le désassemblage). L'anneau Z a virtuellement deux rôles principaux, le premier permettant le recrutement de toutes les autres protéines de division au site de division sous la forme d'anneaux superposés (qui constitue le complexe appelé septasome ou divisome), alors que le second rôle aide à la constriction et à la naissance d'une séparation physique entre les deux cellules filles. En ce qui concerne la constriction, deux modèles biochimiques s'opposent à ce jour. Le premier propose que de petits filaments de FtsZ glissent les uns sous les autres au sein de la macro-structure en anneau, le second quant à lui suggère que de petits filaments de FtsZ se détachent progressivement de l'anneau. Dans les deux cas, la circonférence de l'anneau se réduira progressivement, ce qui conduira à la constriction des membranes et couches de l'enveloppe bactérienne à la seule condition que l'anneau Z soit ancré en membrane (voir point 1.1.4).

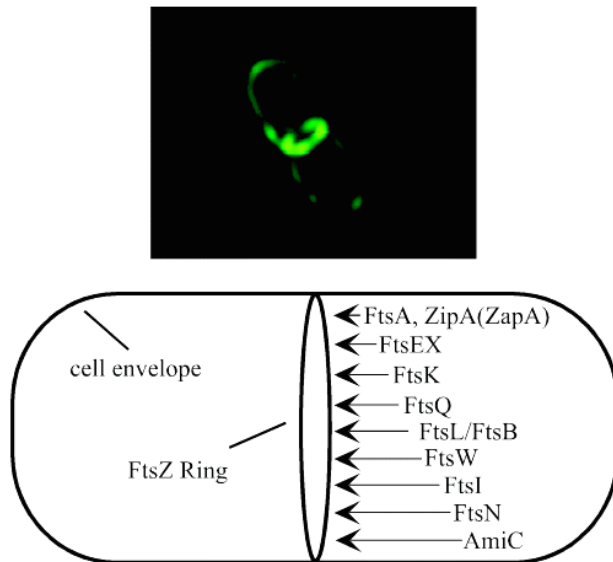


Figure 3: Anneau de septation observé grâce à une fusion traductionnelle FtsL-GFP exprimée dans *E. coli* (haut). Recrutement des protéines de division de *E. coli* au site de division (bas). Images issues de (Weiss, 2004).

B. A après Z

La première protéine à être recrutée par l'anneau Z est FtsA. Cette protéine est dépourvue de segments transmembranaires et elle est associée à l'anneau Z au moyen d'interactions physiques entre FtsZ et FtsA (Ma and Margolin, 1999). Ces mêmes protéines sont présentes chez *E. coli* dans un ratio précis de 1 :100 (FtsA:FtsZ), ratio important pour le bon déroulement de la division bactérienne. Cela signifie qu'un léger déséquilibre dans le ratio des deux protéines mène à un défaut de division (Dai and Lutkenhaus, 1992; Dewar et al., 1992). Cette donnée suggère donc que FtsA est incapable de former un anneau complet à l'image de l'anneau Z et est donc probablement entrelacé au sein de l'anneau Z. FtsA fait partie de la superfamille des ATPases et est capable de lier et d'utiliser l'ATP pour s'autophosphoryler sur un résidu thréonine (Bork et al., 1992). Cependant, le rôle de cette phosphorylation n'est pas encore élucidé. Le rôle principal de FtsA semble être au niveau du recrutement des protéines de division plus tardives puisque ces mêmes protéines tardives requièrent la présence de FtsA pour être recrutées et assurer leurs fonctions.

1.1.4. Ancrage en membrane grâce à ZipA

Comme mentionné plus haut, les modèles de constriction proposés à ce jour nécessitent que l'anneau Z soit ancré en membrane. Sachant que FtsZ est dépourvu de segments transmembranaires, cela implique l'existence de protéine(s) de pontage, c'est-à-dire permettant l'association en membrane de l'anneau Z au moyen d'interactions physiques. Plusieurs candidats protéiques nécessaires à cet ancrage existent, le meilleur étant à ce jour ZipA. ZipA a été identifié chez *E. coli* comme étant un partenaire physique de FtsZ ancré en membrane grâce à un segment transmembranaire N-terminal (Hale and de Boer, 1997). Le recrutement de ZipA au site de division requiert la présence de FtsZ mais pas de FtsA (Hale and de Boer, 1997; Hale and de Boer, 1999; Liu et al., 1999). De manière intéressante, l'anneau Z peut se former en absence de FtsA ou ZipA mais pas de ces deux acteurs, ce qui suggère que ces 2 protéines ont une fonction partiellement redondante dans la formation de l'anneau Z, bien que les deux protéines soient requises ensemble pour les étapes de constriction plus tardives (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). A côté de ZipA, il semblerait que l'une ou l'autre des enzymes transmembranaires impliquées dans la synthèse du peptidoglycan pourrait contribuer à l'ancrage de l'anneau Z en membrane.

1.1.5. Machinerie de synthèse du peptidoglycan septal et protéines associées

La plupart des autres protéines de division que celles présentées ci-dessus ont au moins un segment transmembranaire et un domaine extracellulaire. D'une manière surprenante, la seule de ces protéines ayant une fonction biochimique bien caractérisée est FtsI (ou PBP3) qui est requise pour la synthèse du peptidoglycan au niveau du septum (transversal). Les fonctions précises des autres protéines restent inconnues à ce jour, elles pourraient participer au ciblage de la machinerie de synthèse du peptidoglycan au site de division ou jouer un rôle plus actif dans la synthèse du peptidoglycan ou le remodelage des membranes associées à l'invagination. Une des caractéristiques surprenantes de ces protéines tardives de division bactérienne chez *E. coli* est la linéarité de leur recrutement. En effet, il a été démontré que le pathway d'assemblage suit la logique suivante : $\text{FtsK} \rightarrow \text{FtsQ} \rightarrow [\text{FtsL YgbQ}] \rightarrow \text{FtsW} \rightarrow \text{FtsI} \rightarrow \text{FtsN}$. En d'autres termes, le recrutement de FtsK au site de division ne requiert la présence d'aucune des autres protéines de division tardives alors que FtsN dépend de toutes ces protéines tardives.

A. La PBP-3 FtsI

L'une des dernières étapes de la division bactérienne consiste à synthétiser du peptidoglycan au site de division, qui constituera les nouveaux pôles des cellules filles, grâce à une PBP dédiée. Chez *E. coli*, il s'agit de PBP3 également appelée FtsI (Spratt, 1977). Cette protéine est composée d'un segment transmembranaire suivi d'un domaine peu caractérisé d'environ 200 acides aminés et d'un second domaine d'environ 300 acides aminés qui lui comporte les motifs caractéristiques des sites catalytiques des PBPs (Goffin and Ghuysen, 1998). A ce jour, FtsI est la seule PBP spécifiquement dédiée à la synthèse du peptidoglycan septal (transversal) à avoir été identifiée.

B. Constriction, fermeture du septum et naissance des nouveaux pôles

Parmi les étapes de la division bactérienne, celles traitant de la constriction à proprement parler et de la fermeture du septum sont sans doute les moins bien comprises à ce jour. La constriction se déroule chez *E. coli* par un rétrécissement progressif de la circonférence de l'anneau septal. Comme indiqué plus haut, les mécanismes moléculaires impliqués restent à découvrir. La naissance progressive d'une couche de peptidoglycan transversal pourrait également intervenir dans le processus de constriction.

La fermeture du septum fait intervenir des enzymes spécifiques appelées hydrolases de muréine (constitué notamment de peptidoglycan) qui fonctionnent comme des autolysines. Ces enzymes attaquent soit le squelette de glycan (transglycosylases lytiques), soit les liens entre monomères du squelette de glycan ou les chaînes peptidiques latérales (amidases), soit les liens peptidiques (D,D-endopeptidases). Parmi toutes ces enzymes, deux amidases (AmiA et AmiC) ont particulièrement bien été étudiées. Ces deux enzymes sont exportées dans le périplasme de *E. coli* par la voie de transport de la protéine twin-arginine (Tat) (Bernhardt and de Boer, 2003). Alors qu'une fusion AmiA-GFP est uniformément distribuée dans le périplasme, AmiC-GFP localise au niveau de l'anneau septal durant la division cellulaire (Figure 4) (Bernhardt and de Boer, 2003). La protéine AmiC présente quatre domaines fonctionnels : une séquence signal Tat à l'extrémité N-terminale, un domaine de ciblage, une séquence servant potentiellement de linker et finalement un domaine catalytique amidase en C-terminal. Alors que la séquence signal Tat est requise pour l'export, le domaine de ciblage d'environ 150 acides aminés est nécessaire et suffisant pour recruter AmiC au niveau de l'anneau septal (Bernhardt and de Boer, 2003). Enfin, la localisation d'AmiC dépend de la

présence de FtsN, ce qui fait d'AmiC la dernière protéine connue à être recrutée à l'anneau septal. Plus récemment, une autre hydrolase de muréine a été découverte. Il s'agit de EnvC qui présente de l'homologie de séquence à la lysostaphine et est probablement une endopeptidase clivant les liens peptidiques du peptidoglycan (Bernhardt and de Boer, 2004).

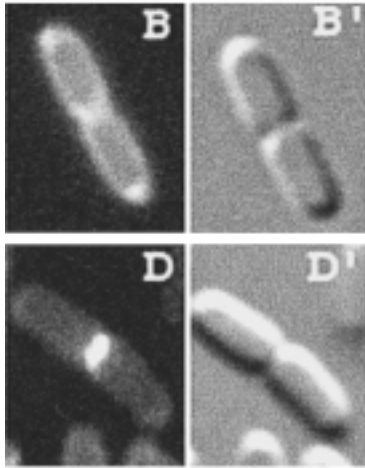


Figure 4: Localisation diffuse de la fusion AmiA-GFP (B et B') et en anneau de la fusion AmiC-GFP (D et D') chez *E. coli*. B et D représentent les images de fluorescence et B' et D' représentent les images DIC. Images issues de (Bernhardt and de Boer, 2003).

1.2. Asymétrie dans la symétrie

Bien que *E. coli* se divise de manière symétrique par fission binaire, une étude originale vient de démontrer que les cellules filles sont fonctionnellement différentes bien que morphologiquement identiques. Cette différence provient de la façon dont *E. coli* croît. En effet, l'insertion de nouveaux précurseurs de peptidoglycan n'est pas homogène chez cette bactérie. Au cours de sa croissance, le peptidoglycan néo-synthétisé est inséré sur toute la longueur du cylindre que représente le bacille *E. coli* en excluant les pôles cellulaires (Figure 5) (de Pedro et al., 1997). Ces pôles sont alors considérés comme inertes d'un point de vue croissance. Lorsque cette même bactérie est sur le point de se diviser, le peptidoglycan est alors synthétisé de manière transversale au site de division (Figure 5). Il en résulte de ce mode de croissance que les pôles sont historiquement différents, les pôles aux extrémités de la bactérie en cours de croissance représentée dans la figure 5 étant plus vieux que les pôles émergeant du processus de division (appelés nouveaux pôles) et ce pour une seule génération. Si l'on continue le raisonnement, les quatre cellules filles issues d'un second événement de division auront des pôles d'âges différents selon la configuration suivante : 2 cellules ayant un pôle d'au moins 2 générations et un nouveau pôle issu du nouvel événement de division, et 2 autres cellules ayant un pôle d'une génération et un nouveau pôle issu du même nouvel événement de division. De génération en génération, les bactéries filles seront donc constituées de pôles plus ou moins vieux comme l'illustre la figure 6. Partant de cette observation logique, l'équipe de François Taddei a démontré que les bactéries ayant les pôles les plus vieux (considérées comme étant les plus vieilles cellules puisqu'ayant le peptidoglycan le plus ancien au moins à un pôle) montraient un retard progressif de croissance (Stewart et al., 2005). Pour ce faire, les chercheurs ont filmé sous microscope la division de plus de 90 microcolonies sur 9 générations, représentant un peu plus de 35000 bactéries (Stewart et al., 2005). Cette découverte a permis aux auteurs de proposer que *E. coli* était sujet au vieillissement bien que cette bactérie se divise de manière symétrique. En d'autres termes, bien que ne montrant aucun signe de différence morphologique, les cellules filles issues d'un événement de division ont un passé différent, et peuvent être fonctionnellement différentes.

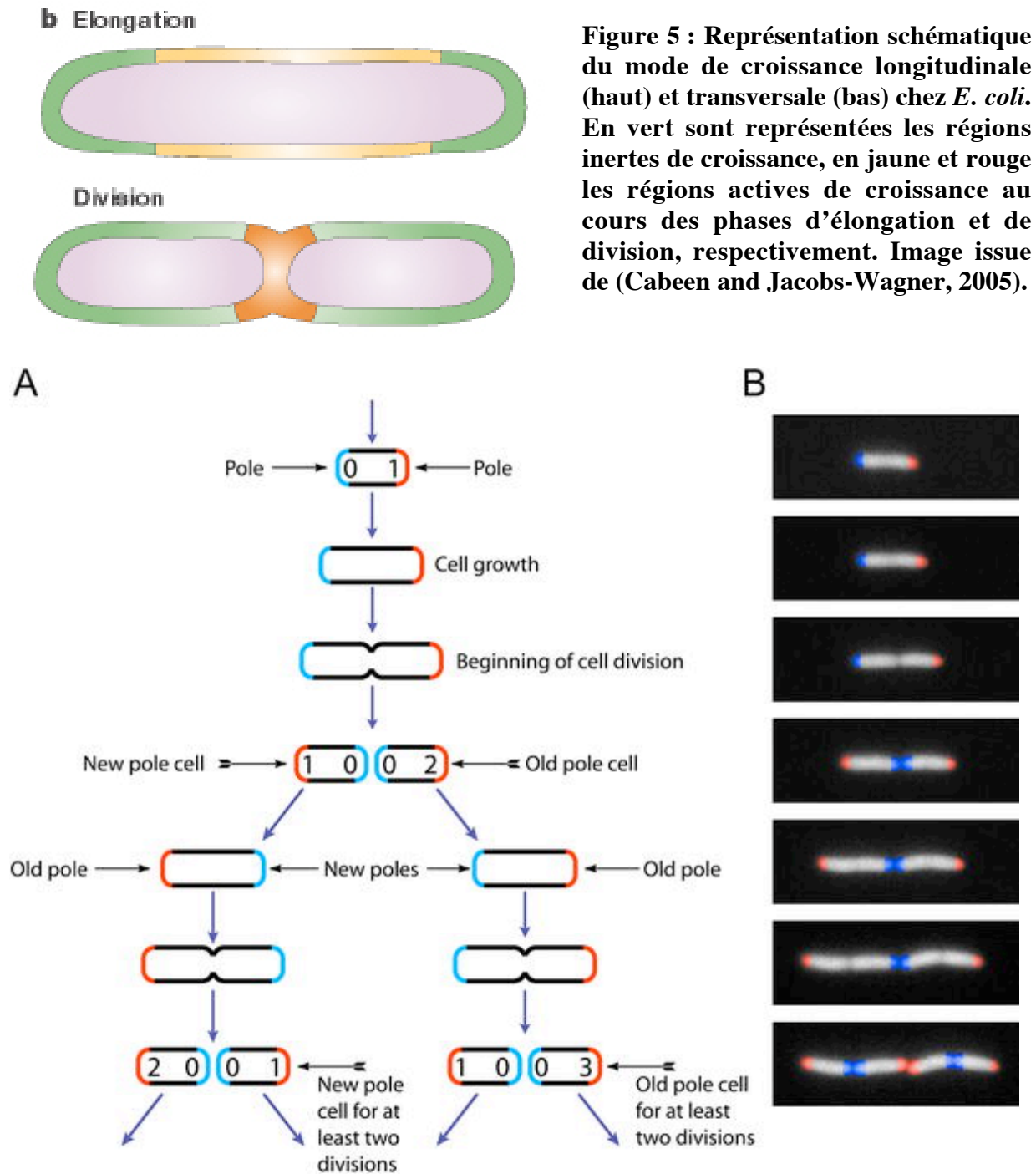


Figure 6: Schéma illustrant le lignage de *E. coli* au cours des générations. Les nouveaux et vieux pôles sont respectivement représentés en bleu et rouge. Les numéros indiquent le nombre de génération associé à chacun des pôles. A droite (B), les pôles d'une bactérie *E. coli* au cours de 2 événements de division ont été colorés comme indiqué ci-dessus. Image issue de (Stewart et al., 2005).

1.3. Division asymétrique, les cas de *Bacillus subtilis* et *Caulobacter crescentus*

1.3.1. Spécificités de la division chez 3 espèces bactériennes modèles

Outre *E. coli*, la division bactérienne a été étudiée en détails chez deux autres espèces bactériennes, *B. subtilis* et *C. crescentus*. Même si globalement le processus de division est similaire et fait intervenir la plupart des mêmes protéines de division chez ces 3 espèces, quelques différences notables sont à souligner.

Une des différences majeures entre la division bactérienne de *B. subtilis* et de *E. coli* réside dans la façon dont les protéines sont assemblées. En effet, contrairement à *E. coli* pour qui les protéines de division s'assemblent de manière linéaire, *B. subtilis* agence son anneau septal d'une manière plus coopérative. Cela signifie que la localisation de chacune des protéines impliquées dans la division de cette espèce bactérienne dépend de la présence de toutes les autres protéines de division, à l'exception de FtsZ qui ne dépend d'aucune autre protéine et de FtsA qui dépend uniquement de la présence de FtsZ (Errington et al., 2003). Une autre différence importante dans le mécanisme de division de *B. subtilis* par rapport à *E. coli* est associée à l'absence d'invagination de la membrane. En effet, les étapes finales de division consistent à synthétiser une paroi septale épaisse, caractéristique des bactéries à Gram-positif, sans que n'apparaisse une quelconque trace d'invagination. De plus, il existe également une différence dans le mode de fonctionnement du système Min. D'une part, il n'existe pas d'homologue de séquence de MinE mais un analogue fonctionnel appelé DivIVA (Edwards and Errington, 1997). D'autre part, le système Min, bien qu'ayant la même finalité à savoir d'inhiber la formation d'anneau Z aux pôles, est complètement statique chez *B. subtilis*. En d'autres termes les complexes inhibiteurs de division MinCD sont maintenus aux pôles de *B. subtilis* grâce à DivIVA (Marston et al., 1998). Pour terminer, bien que se divisant de manière parfaitement symétrique à l'image de *E. coli*, cette bactérie est capable dans certaines conditions d'initier une division polaire. Cet événement se déroule lors de la sporulation de *B. subtilis* et sera discuté aux points suivants.

La division bactérienne de *C. crescentus* se démarque de celle de *E. coli* par le fait que ce processus est précisément régulé en fonction du cycle cellulaire (Quardokus and Brun, 2002; Quardokus et al., 2001). En effet, contrairement à *E. coli*, *C. crescentus* ne réplique son chromosome qu'une seule fois par cycle cellulaire et la plupart des mécanismes cellulaires sont contrôlés en fonction de l'étape du cycle auquel la bactérie se trouve. Il en résulte que l'expression des gènes encodant les protéines de division, tout au moins *ftsZ*, *ftsA* et *ftsQ*, est induit uniquement au stade prédivisionnel qui correspond précisément au moment du cycle de *C. crescentus* auquel ces protéines sont requises (Martin et al., 2004; Sackett et al., 1998). De plus, ces mêmes protéines sont rapidement dégradées par protéolyse juste après que la division soit achevée (Martin et al., 2004). Enfin, ces mêmes protéines sont capables de se localiser aux pôles de la bactérie avant d'être assemblées à l'anneau septal (Martin et al., 2004; Quardokus et al., 2001). Une autre différence notable est l'absence d'un système Min chez *C. crescentus*. Par contre, il existe une protéine essentielle chez cette espèce qui remplace fonctionnellement une partie des fonctions assurées par le système Min. Cette protéine, MipZ, forme un complexe avec la protéine de partition du chromosome ParB près des origines de répllication nouvellement dupliquées (Thanbichler and Shapiro, 2006). Non seulement, ce complexe permet de séparer correctement les chromosomes répliqués en « tirant » chacune des copies chromosomiques vers les pôles, mais inhibe également la formation de l'anneau Z dans les régions polaires, là où la concentration en MipZ est la plus importante. C'est à ce niveau que MipZ représente un analogue fonctionnel de MinC, d'autant plus qu'un mutant conditionnel de *mipZ* donne le phénotype caractéristique de minicells. Enfin, une des différences les plus importantes dans les mécanismes de division chez *C.*

C. crescentus par rapport à *E. coli* se situe au niveau du positionnement de l'anneau Z puisque contrairement à *E. coli*, *C. crescentus* se divise de manière asymétrique. En effet, l'anneau septal est positionné de façon légèrement excentrée par rapport au centre équatorial. Ceci a pour conséquence qu'après division, deux cellules morphologiquement et fonctionnellement différentes naissent, une petite bactérie flagellée et une plus grande pédonculée (section 1.3.3).

1.3.2. Spores issues d'une division asymétrique chez *B. subtilis*

Le premier événement morphologique crucial que subit *B. subtilis* en entrant dans une phase de sporulation est une division cellulaire asymétrique. Celle-ci correspond à une version modifiée du processus de division utilisé lors de la croissance végétative qui fait intervenir plusieurs facteurs spécifiques de sporulation (Errington, 2003). Comme indiqué plus haut, la division bactérienne est accomplie par une machinerie conservée assemblée autour de l'anneau Z. Durant la sporulation, cette machinerie est redirigée à une position proche d'un pôle cellulaire et l'ultrastructure du septum est modifiée de manière à ce qu'il contienne moins de matériel pariétal. Ce même matériel pariétal sera alors retiré plus tard dans le processus de sporulation. La position polaire de l'anneau Z fait intervenir la protéine SpoIIIE ainsi qu'une augmentation de la concentration en FtsZ. Plus qu'un positionnement aux pôles, il s'agirait plutôt d'un repositionnement de l'anneau Z, initialement installé au centre cellulaire, qui se manifeste par un désassemblage de l'anneau central sous la forme d'une spirale se dirigeant vers les pôles (Figure 7) (Ben-Yehuda and Losick, 2002).

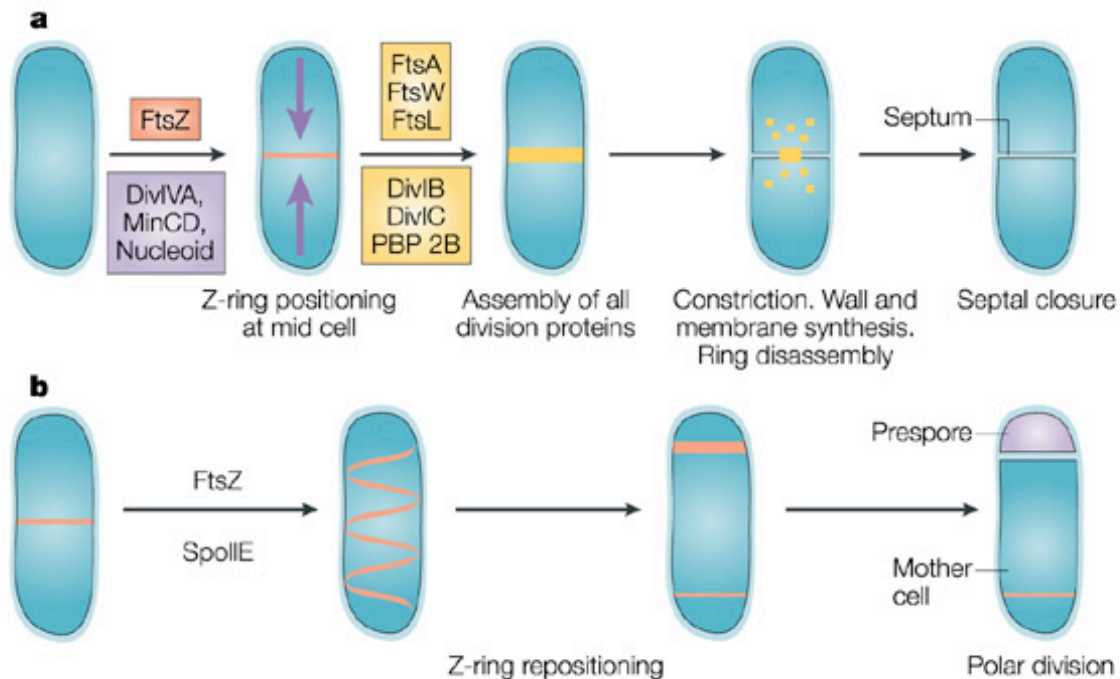


Figure 7: Modèle schématique de la division de *B. subtilis* durant les phase de croissance végétative (a) et de sporulation (b). Voir section 1.3.2 pour les détails. Image issue de (Errington, 2003).

La raison pour laquelle un seul des deux anneaux Z assemblés (Figure 7) est mûr en anneau septal, c'est-à-dire qu'il est capable de recruter les autres protéines de division, reste mystérieuse à ce jour. En outre, il reste à comprendre la façon dont procède SpoIIE pour identifier le site de division polaire, et les raisons pour lesquelles cet anneau septal polaire est capable de contourner les régulations négatives assurées par le « Nucleoid Occusion » et le système Min.

1.3.3. *C. crescentus* : une grande pour s'attacher et une petite pour nager

Les membres du genre *Caulobacter* sont des bactéries dimorphiques pédonculées à une de leurs extrémités. Le dimorphisme caractéristique de ce genre est maintenu grâce à une division asymétrique obligatoire se déroulant à chaque cycle reproductif (Figure 8). Cette division asymétrique donne naissance à deux cellules filles génétiquement identiques, mais morphologiquement et fonctionnellement différentes: une petite bactérie flagellée et mobile, et une plus grande bactérie immobile possédant un pédoncule adhésif (Janakiraman and Brun, 1999). Les deux cellules filles héritent également de programmes de développement différents. La cellule fille pédonculée peut immédiatement initier un nouveau cycle de réplication, alors que la cellule fille flagellée et mobile doit impérativement se différencier en cellule pédonculée avant d'initier un nouveau cycle (Figure 8). En d'autres termes, la réplication d'ADN et la division bactérienne sont inhibées durant le temps pendant lequel la cellule flagellée est mobile. Les détails concernant les étapes de différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée seront expliqués aux points suivants.

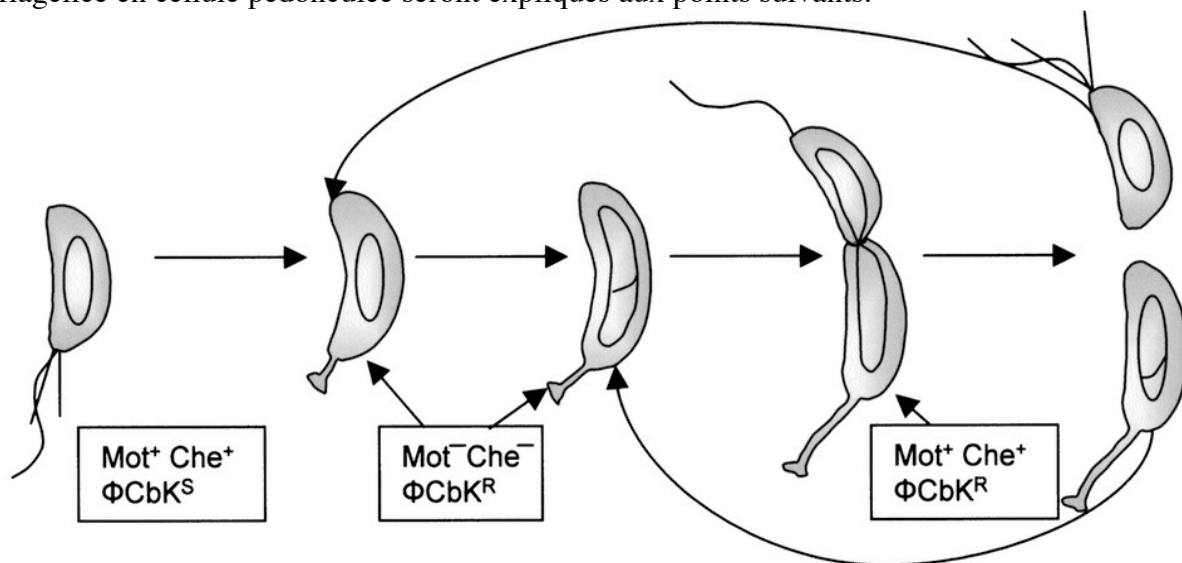


Figure 8: Représentation schématique du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Mot, Che and ΦCbK^R and ΦCbK^S représentent respectivement « Motility », « Chemotaxis », « Resistance to ΦCbK » and « Sensitivity to ΦCbK ». Image issue de (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003).

2. Différenciation bactérienne

Cette deuxième partie de l'introduction s'inspire principalement des références suivantes : (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003; England and Guber, 2001; Errington, 2003; Piggot and Hilbert, 2004; Skerker and Laub, 2004)

Dans les deux exemples de division asymétrique présentée ci-dessus, la sporulation chez *B. subtilis* et le cycle de vie de *C. crescentus*, chacune des cellules filles issues d'un événement de division asymétriques mettront en place un programme spécifique de développement assimilé à une différenciation bactérienne.

2.1. La sporulation

La sporulation chez *B. subtilis* se déroule en plusieurs étapes. La première consiste en la formation d'une endospore suite à un événement de division asymétrique comme illustré ci-dessus. Ensuite, la petite cellule issue de cette division asymétrique s'engouffre dans la plus grande cellule (cellule mère ou sporange) de manière à créer la préspore. Il s'en suit une série de modifications, qui permettent la maturation de la préspore ainsi que la dégradation de la cellule mère (Figure 9).

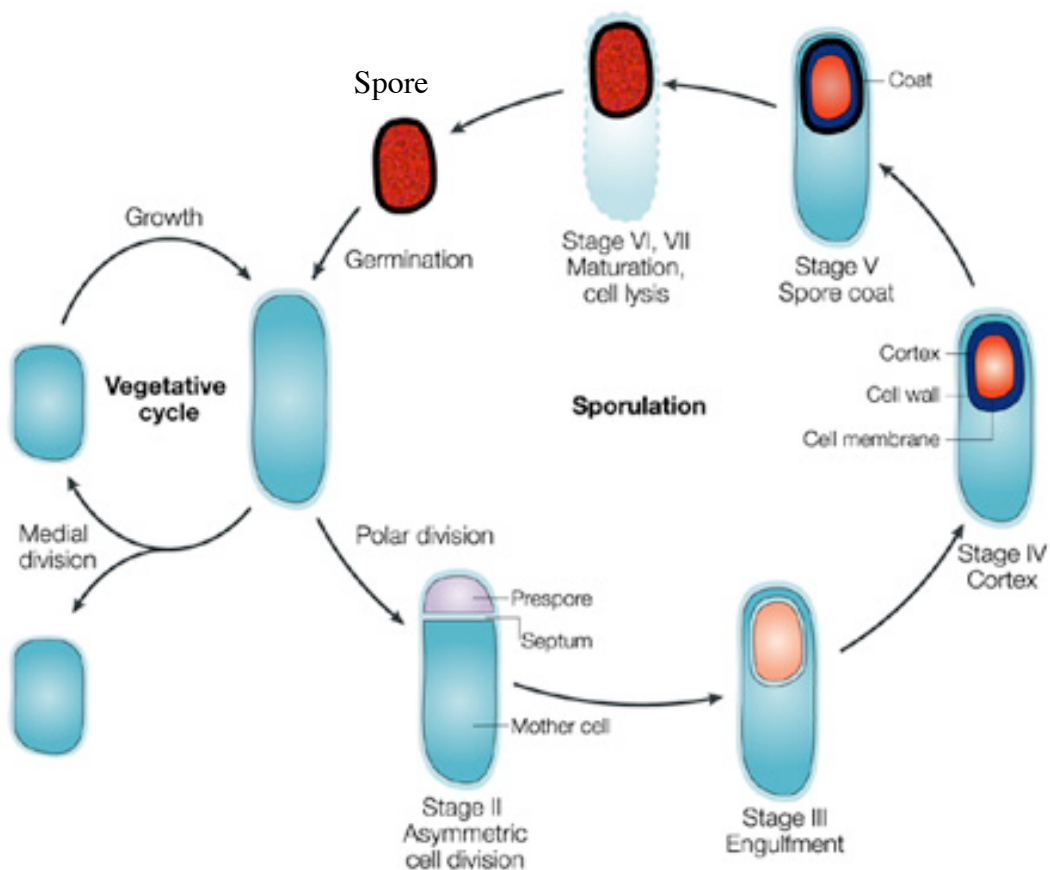


Figure 9: Représentation schématique simplifiée du cycle de sporulation chez *B. subtilis*. Image issue de (Errington, 2003).

2.1.1. Initiation de la sporulation

Le stimulus principal initiant la sporulation est sans nul doute la famine. Les voies d'intégration de ces signaux sont complexes et multiples, et l'une d'entre elles est centrée sur le régulateur de réponse Spo0A qui contrôle plus de 120 gènes (voir plus bas). Ces voies de régulation mènent à l'activation de certains gènes spécifiques de la sporulation, tels que *spoIIA*, *spoIIIE* et *spoIIIG*. Le second acteur central permettant d'initier la sporulation est le facteur sigma H (σ^H) qui contrôle à lui seul près de 90 gènes (Britton et al., 2002). La complexité avec laquelle l'initiation de la sporulation est régulée (voir plus bas) reflète sans doute le fait que *B. subtilis* doit faire face à des conditions très stringentes dans son milieu naturel qu'est le sol, sans nécessairement initier de façon systématique la sporulation. En effet, cette dernière est sans doute à considérer comme une réponse ultime utilisée uniquement comme dernier ressort.

2.1.2. Ségrégation du chromosome dans la préspore

La division asymétrique engendre un problème stérique de l'ADN auquel *B. subtilis* doit faire face. En effet, lors de l'initiation de la formation de la spore, le chromosome doit être transféré dans un espace plus confiné que lors de la croissance végétative, à savoir la préspore. Plusieurs études ont permis de démontrer que la ségrégation du chromosome au sein de la préspore se déroule de manière non conventionnelle en deux étapes (Figure 10). La première consiste à rapprocher un segment central du chromosome près du pôle proche de la division. La formation du septum de sporulation capture alors approximativement un tiers du chromosome dans le petit compartiment de la préspore. Le reste du chromosome est ensuite « pompé » au travers du septum en formation grâce notamment à un transporteur d'ADN, SpoIIIE, un homologue de FtsK. Une autre protéine joue un rôle important dans la ségrégation du chromosome dans la préspore, DivIVA. Durant la phase végétative de croissance, cette protéine dirige les complexes MinCD vers les pôles de *B. subtilis*, endroit où la division bactérienne doit être exclue (voir le système Min, à la section 1.1.2B). Dans les bactéries en sporulation, il joue notamment un rôle d'ancrage de l'origine de réplication chromosomique (*oriC*) aux pôles en vue de la division asymétrique (Thomaides et al., 2001). Cet ancrage polaire de l'*oriC* fait intervenir au moins deux autres protéines aux fonctions partiellement redondantes, Soj et Spo0J. Bien que leurs fonctions ne soit pas clairement définies, elles semblent requises lors de la ségrégation des chromosomes, aussi bien lors de la croissance végétative que lors de la sporulation (Glaser et al., 1997; Lin and Grossman, 1998). Soj a la particularité de s'associer au nucléoïde et de « sauter » d'un nucléoïde à un autre. Ces sauts semblent être stimulés par Spo0J, dès lors qu'en absence de Spo0J, Soj s'associe de manière complètement statique et non-spécifique à de l'ADN chromosomique, entraînant un blocage de la transcription de plusieurs gènes de sporulation (Marston and Errington, 1999; Quisel and Grossman, 2000; Quisel et al., 1999). RacA est une autre protéine impliquée dans l'ancrage de l'*oriC* aux pôles. L'absence de cette protéine engendre un problème de capture de l'*oriC* dans à peu près 50% des cellules en sporulation, et cet effet est exacerbé lorsqu'une mutation *racA* est combinée à des mutations *soj* ou *spo0J* (Wu and Errington, 2003).

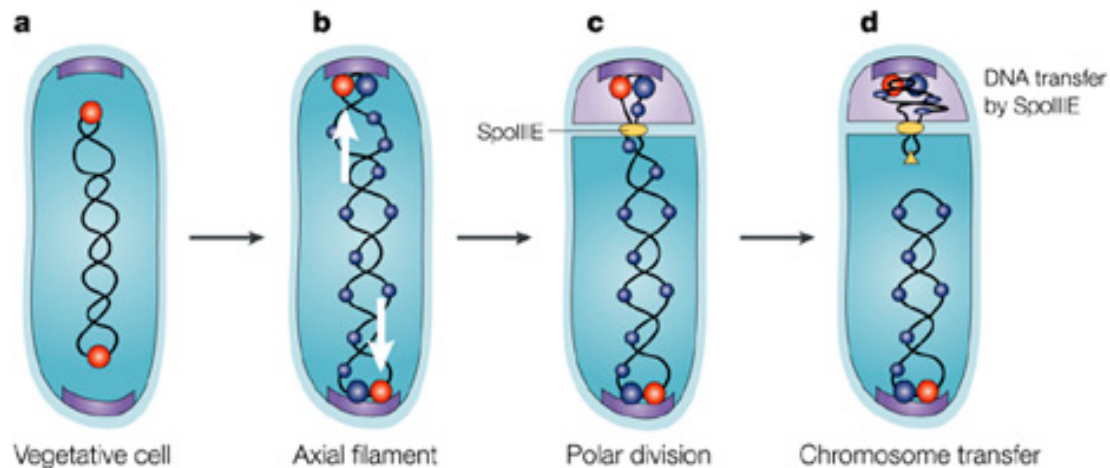


Figure 10: Ségrégation du chromosome dans la préspore. Dans la cellule végétative (a), la protéine Spo0J se lie aux régions autour de l'origine de réplication chromosomique (*oriC*) de manière à former des foci (rouge) importants pour la ségrégation du chromosome. Durant les phases précoces de la sporulation (b), les régions *oriC* migrent vers les pôles cellulaires auxquels ils s'accrochent au moyen notamment des protéines RacA (représentée en bleu) et DivIVA (violet). La division asymétrique permettra alors de « trapper » l'équivalent d'à peu près un tiers du chromosome dans la préspore (c). La protéine SpoIIIE (jaune) est alors recrutée au niveau du septum en formation où elle forme un pore au travers duquel la portion restante du chromosome sera transloquée achevant ainsi la ségrégation du chromosome dans la préspore (d). Image issue de (Errington, 2003).

2.1.3. Induction de la transcription cellule-spécifique

Les mécanismes décrits dans les deux paragraphes précédents permettent de séparer les bactéries sporulantes en deux compartiments de taille différente, une petite préspore et une cellule mère beaucoup plus grande, et de ségréger un chromosome complet dans chacun de ces compartiments. A ce stade, la formation d'un septum asymétrique permet d'initier des programmes d'expression de gènes. Deux facteurs sigma, σ^E et σ^F , sont cruciaux dans l'allumage de ces programmes d'expression de gènes (pour une revue récente, voir Dworkin, 2003). Tous deux sont synthétisés avant la formation du septum, mais restent inactifs le temps que le septum se forme. σ^F est le premier à être activé et son activité est contrôlée par deux mécanismes distincts qui agissent de manière complémentaire de façon à assurer que ce facteur ne soit activé uniquement dans la préspore nouvellement formée (Figure 11). Le premier mécanisme requiert SpoIIAB qui est un facteur anti-sigma. Il se lie à σ^F l'empêchant de se lier à l'ARN polymérase. En outre SpoIIAB est une protéine kinase qui peut interagir avec un facteur anti-anti-sigma, SpoIIAA, et le phosphoryler sur un résidu sérine. Dans sa forme non-phosphorylée, SpoIIAA interagit avec le complexe inactif SpoIIAB- σ^F , ce qui aura comme conséquence de déplacer le facteur sigma (σ^F) avant que SpoIIAA ne soit lui-même phosphorylé et inactivé. En d'autres termes, la libération de σ^F dépendra principalement de la réserve de SpoIIAA non-phosphorylé présente dans la préspore en formation. Cette réserve de protéine est elle-même contrôlée par la protéine SpoIIIE qui agit comme une phosphatase grâce à son domaine C-terminal, et peut dès lors déphosphoryler les versions phosphorylées de SpoIIAA. Bien que les détails moléculaires de ces voies de régulations ne soient pas complètement élucidés, il semblerait que la protéine SpoIIIE joue un rôle central. En effet, SpoIIIE est associé à la machinerie de division et sa libération dans le compartiment de la

préspore en fin de division permet d'enrichir la version déphosphorylée de SpoIIAA dans ce même compartiment (Wu et al., 1998b). Un second niveau de régulation intervient dans l'activation de σ^F . Il est basé sur l'instabilité de la protéine SpoIIAB et la position de son gène (*spoIIAB*) qui se situe sur le chromosome circulaire à peu près à l'opposé de l'*oriC*. A cette position, *spoIIAB* est l'un des derniers gènes à être transféré dans la préspore en formation. De par l'instabilité intrinsèque de la protéine SpoIIAB, il en résulte que la concentration de cette protéine dans la préspore reste faible pendant une période d'environ 10 minutes, ce qui permet à σ^F d'y être actif au moins pendant cet intervalle de temps (Dworkin and Losick, 2001).

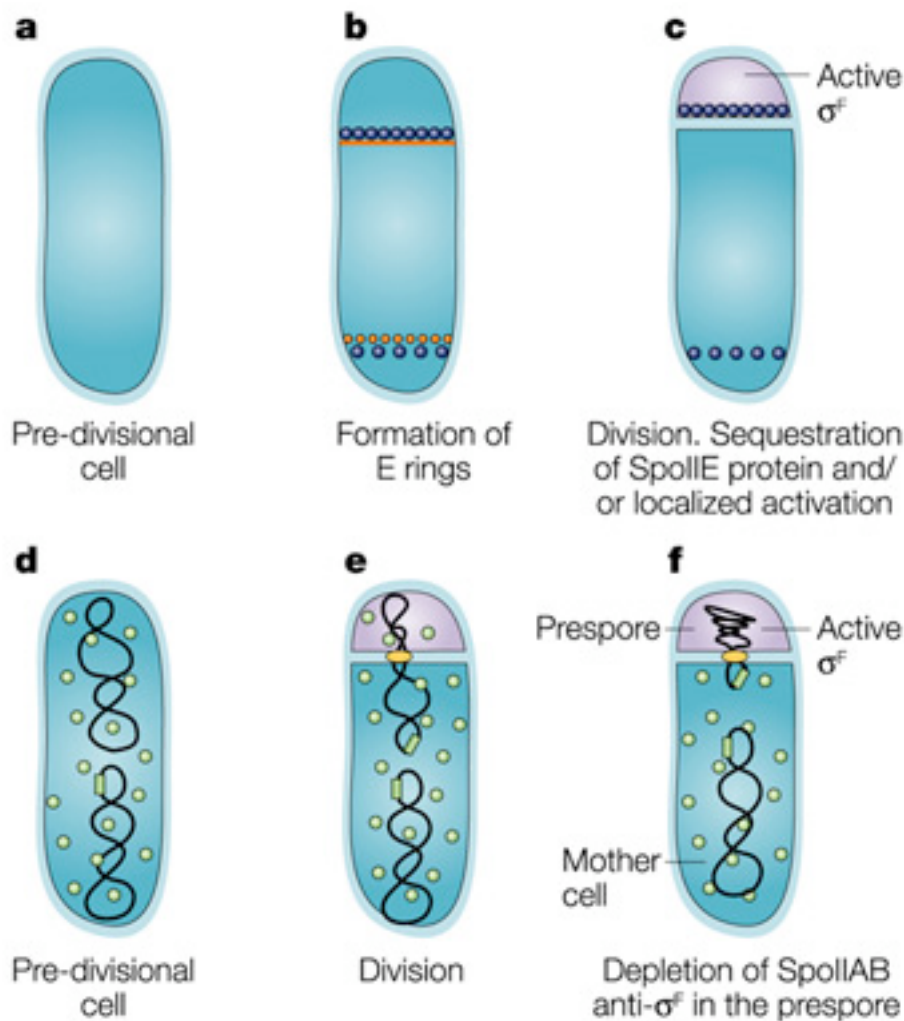


Figure 11: Deux mécanismes contrôlent la compartimentalisation de l'activité de σ^F dans la préspore. (a-c) La protéine SpoIIIE (boules bleues) a une activité phosphatase qui maintient le niveau de la forme non-phosphorylée de SpoIIAA suffisamment bas que pour permettre la libération de σ^F complexé par SpoIIAB. La localisation de SpoIIIE à l'anneau septal (b, boules mauves) permet son enrichissement dans la préspore en formation. La position du gène *spoIIAB* sur le chromosome (d-f, rectangles verts) ainsi que l'instabilité de la protéine correspondante SpoIIAB (d-f, boules vertes) assurent une faible concentration de cette protéine dans la préspore en formation, avant que le gène *spoIIAB* ne soit passé. Image issue de (Errington, 2003).

2.2. La double vie de *C. crescentus*

C. crescentus est un organisme de choix pour l'étude du cycle cellulaire et de la différenciation des bactéries. En effet, cette espèce se divise de manière asymétrique générant à chaque cycle de division deux cellules morphologiquement et fonctionnellement différentes, une cellule flagellée et une cellule pédonculée. Il est possible d'obtenir facilement des populations pures de cellules flagellées qui initieront en même temps une différenciation en cellule pédonculée et un nouveau cycle de réplication (Figure 12). Cette particularité a permis notamment d'étudier non seulement les changements morphologiques de cette bactérie au cours de son cycle cellulaire, ainsi que l'interdépendance de ces mêmes changements (voir plus bas), mais aussi le profil d'expression de chacun des quelques 3800 gènes de *C. crescentus* au cours d'un cycle cellulaire et dans les deux types cellulaires (Laub et al., 2002; Laub et al., 2000). Il en est ressorti de ces études que les gènes impliqués dans les processus cellulaires tels que la réplication d'ADN, la division bactérienne ou encore la synthèse du flagelle sont spécifiquement exprimés au moment où leurs fonctions sont requises (Figure 12). De plus, le programme génétique mis en place dans les deux types cellulaires, la cellule flagellée et pédonculée est également différent, soulignant le fait qu'en plus d'être morphologiquement et fonctionnellement différentes, ces deux types de cellules expriment un programme de développement différent à partir d'un même génome. Ceci rappelle les différences observées entre la cellule mère et la préspore chez *B. subtilis* comme illustré plus haut.

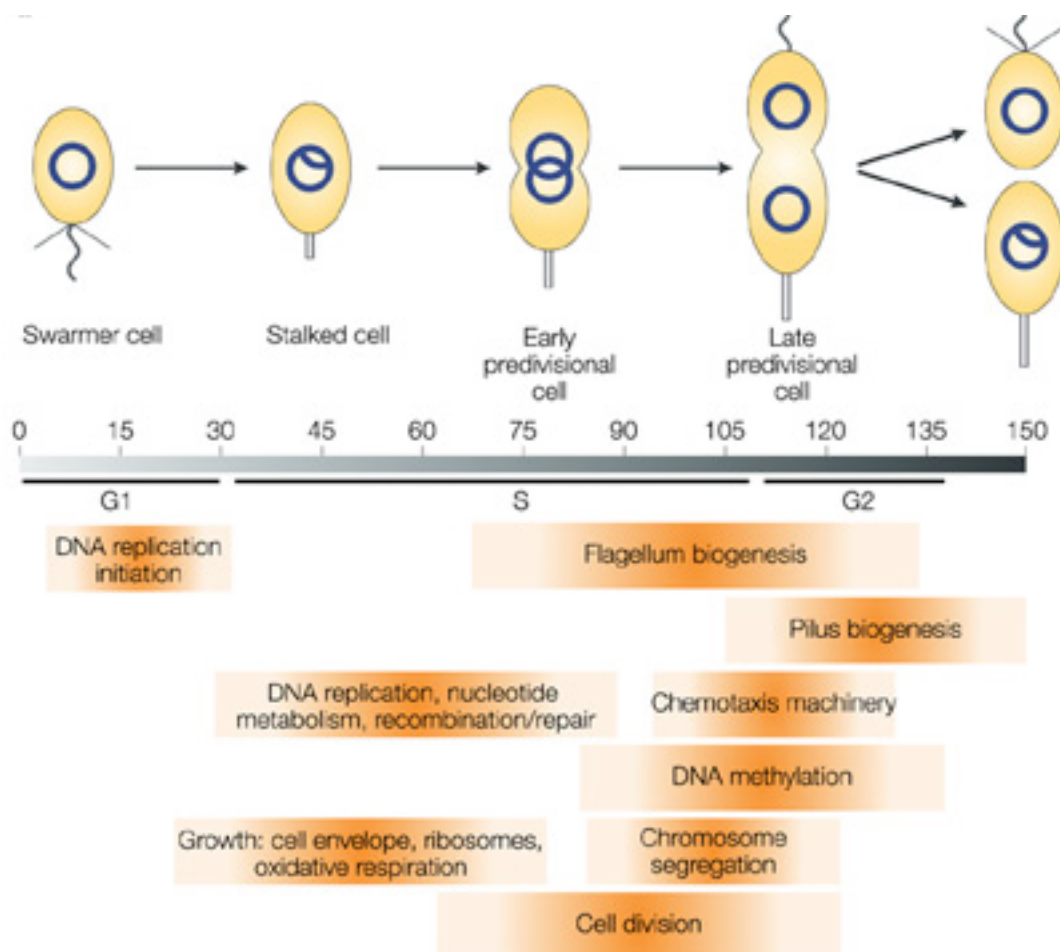


Figure 12: Progression du cycle cellulaire de *C. crescentus*. La cellule flagellée et piliée se différencie en cellule pédonculée lors de la transition appelée G1-S, G1 correspondant à la période durant laquelle la cellule reste flagellée et piliée et S correspondant au moment où la réplication du chromosome se déroule. Cette différenciation implique l'éjection du flagelle, la rétraction des pili polaires, la biogenèse du pédoncule au pôle préalablement occupé par le flagelle et l'initiation de la réplication d'ADN. Les processus cellulaires sont induits à différents moments du cycle cellulaire, les barres horizontales orange représentant ces fenêtres de temps. L'échelle de temps est exprimée en minutes Image issue de (Skerker and Laub, 2004).

2.2.1. Interdépendance et checkpoints entre processus cellulaires et développementaux

Tout d'abord, les processus cellulaires majeurs et les événements de développement sont initiés selon une séquence précise chez *C. crescentus*. Mitchinson fut le premier à proposer que la succession des processus cellulaires pourrait être médiée par une série d'étapes pour lesquelles la séquence est déterminée par leur organisation en voies dépendantes, où les étapes successives ont une relation entre elles (Mitchison, 1971). Cette idée fut alors développée en étudiant l'impact sur une étape d'une voie en inhibant une étape d'une autre voie et a permis de montrer qu'il existait au moins deux voies dépendantes, celle liée à la synthèse d'ADN et l'autre à la division bactérienne (Osley and Newton, 1980). Ces deux voies suivent respectivement les séquences suivantes : DNAi, DNAe et DNAc (i, e et c indiquant respectivement l'initiation, l'élongation et la terminaison (completion en anglais) de la synthèse d'ADN) ; Divi, Divp et CS (pour l'initiation, la progression de la division et la séparation des cellules) (Figure 13). Des mutants ont été sélectionnés pour leur faculté à être spécifiquement bloqués à l'une ou l'autre de ces étapes (Osley and Newton, 1980) et l'analyse de ces mutants a permis de mettre en évidence les deux voies en question. En résumé, une étape tardive dans ces voies dépend de l'accomplissement d'une étape plus précoce, par exemple, l'élongation de la synthèse d'ADN (DNAe) dépend du bon déroulement de l'initiation de la synthèse d'ADN (DNAi). En outre, comme indiqué plus tôt, ces deux voies sont dépendantes l'une de l'autre, en ce sens que la division ne s'initiera (Divi) qu'à la condition que l'élongation de l'ADN soit en cours (DNAe) ; et que la séparation des cellules filles (CS) ne s'opérera que lorsque l'ADN sera complètement répliqué (DNAc) (Figure 13). D'autre part, le cycle de réplication d'ADN devrait être représenté sous la forme d'un cercle en ce sens que l'accomplissement de la réplication d'ADN (DNAc) est nécessaire à une réinitiation de la réplication (DNAi). Ce dernier checkpoint a pour conséquence que *C. crescentus* ne réplique son ADN chromosomique qu'une seule fois par cycle, contrairement à *E. coli* qui elle peut répliquer plusieurs fois son matériel génétique lors de chaque cycle. En outre, *C. crescentus* n'initiera la réplication de son chromosome dans un seul type cellulaire, la cellule pédonculée.

De manière plus surprenante, les événements de développement dépendent également de certaines étapes des voies de la synthèse de l'ADN ou de la division bactérienne. Citons à titre d'exemple la biosynthèse du flagelle qui est initiée en milieu de phase S, c'est-à-dire lorsque la réplication d'ADN est en cours d'élongation (DNAe). Autrement dit, si la réplication d'ADN est bloquée à l'étape d'initiation (DNAi), les gènes flagellaires ne sont pas transcrits. Bien que les gènes flagellaires soient exprimés et que les produits de ces gènes soient assemblés, le flagelle ne commencera à tourner qu'une fois la séparation physique des deux cellules filles (CS) accomplie. La formation des pili ne se fera, elle, qu'à partir du moment où le flagelle commencera à tourner, et est donc également dépendante de l'étape CS. La biogenèse du pédoncule dépend elle aussi de la division bactérienne puisqu'un traitement à la

pénicilline G, qui inhibe la synthèse de la paroi septale, bloque la croissance de cet appendice polaire. Le programme de développement spécifique de la cellule flagellée suit également une séquence précise qui sera discutée plus bas. En résumé, les événements liés au développement de *C. crescentus*, et donc de sa différenciation, seront mis en place à la condition que certains processus cellulaires (synthèse d'ADN ou division cellulaire) soient initiés, en cours ou terminés. Plusieurs checkpoints, chacun responsable du relais de l'information entre l'état du processus en question et l'évènement de développement qui lui est lié, ont été caractérisés (voir plus bas). Enfin, les séquences de processus et de développement coïncident parfaitement avec la séquence d'expression des gènes directement impliqués dans ces mêmes processus cellulaires et événements de développement (Laub et al., 2002; Laub et al., 2000).

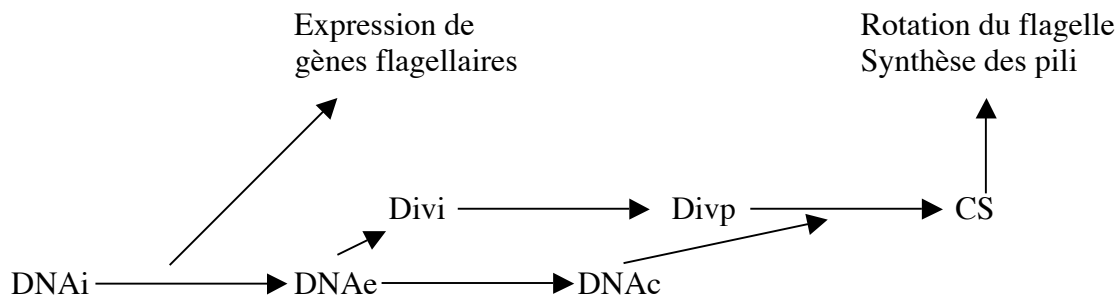


Figure 13: Organisation des voies de synthèse d'ADN et de division bactérienne, et leur interdépendance.

2.2.2. L'initiation de la réplication d'ADN

Comme indiqué plus haut, l'initiation de la réplication de l'ADN chromosomique de *C. crescentus* est régulée aussi bien temporellement que spatialement. En effet, seule la cellule pédonculée est capable d'initier la réplication d'ADN. Plusieurs produits de gènes contrôlent le minutage de l'initiation de la réplication d'ADN, notamment les régulateurs globaux CtrA et GcrA et le tmRNA SsrA.

A. Le régulateur de réponse CtrA

Le régulateur de réponse CtrA contrôle l'expression de nombreux gènes régulés en fonction du cycle cellulaire, plus précisément 26% des 553 gènes dont la transcription varie en fonction du cycle cellulaire (Laub et al., 2002; Laub et al., 2000). En plus de réguler l'expression de plus d'une centaine de gènes, CtrA est également capable de se lier à 5 séquences opératrices de consensus TTAA-N₇-TTAAC au niveau de l'origine de réplication (Quon et al., 1998). Ces 5 séquences recouvrent la zone autosuffisante pour supporter une réplication, et donc de ce fait la région minimale *oriC* de *C. crescentus*. Cette liaison a pour conséquence d'empêcher l'initiation de la réplication d'ADN. Comme illustré plus bas, la régulation fine aux niveaux temporel et spatial de CtrA grâce à 3 mécanismes complémentaires (transcription, phosphorylation et dégradation protéolytique) fait de ce régulateur le principal acteur responsable du checkpoint d'initiation de la réplication d'ADN. En effet, sous l'action combinée des 3 mécanismes cités ci-dessus, il en résulte que CtrA est présent sous sa forme phosphorylée (donc active) uniquement dans la cellule flagellée et dans le compartiment « swarmer » de la cellule prédivisionnelle (Figure 14). À l'inverse, il est absent de la cellule pédonculée. Ce dimorphisme moléculaire a pour conséquence de ne permettre d'initier la réplication uniquement dans la cellule pédonculée.

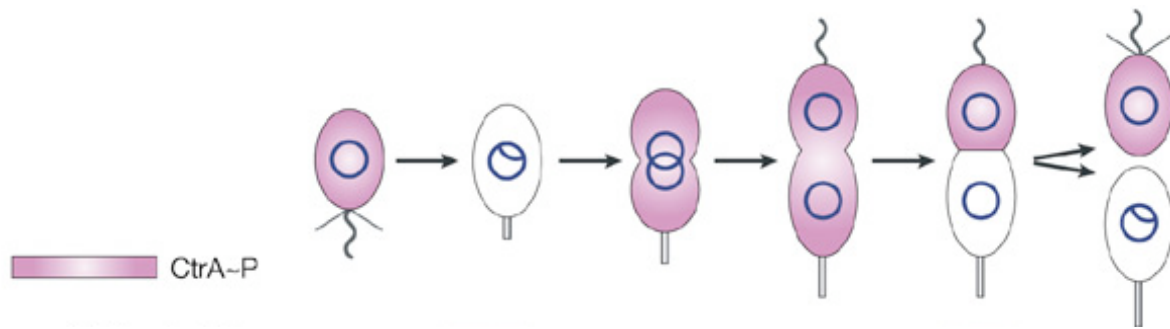


Figure 14: Régulation spatiale et temporelle du régulateur de réponse CtrA. La présence de la forme phosphorylée de CtrA dans les différents types cellulaires et à différents moments du cycle cellulaire est représentée en rose. Image issue de (Skerker and Laub, 2004).

B. Le régulateur global GcrA

A l'image de CtrA, GcrA est un régulateur global qui contrôle l'expression d'un peu plus de 120 gènes au cours du cycle cellulaire (Holtzendorff et al., 2004). De manière intéressante, l'abondance de GcrA oscille dans une phase opposée à celle de CtrA (Figure 15). De plus, ces deux régulateurs se contrôlent de manière réciproque, CtrA contrôlant négativement l'expression de *gcrA* et GcrA activant l'expression de *ctrA*. Cette boucle de régulation engendre des vagues d'abondance de ces deux protéines au cours du cycle cellulaire, permettant ainsi le contrôle de l'expression de gènes à des moments clés du cycle cellulaire. Par exemple, la disparition de CtrA dans la cellule pédonculée permet de libérer l'*oriC* mais également d'activer l'expression de *gcrA*, lui-même requis pour l'induction de l'expression des gènes encodant les protéines initiateuses de la réplication de l'ADN, qui pourront alors user de l'*oriC* libérée (Holtzendorff et al., 2004).

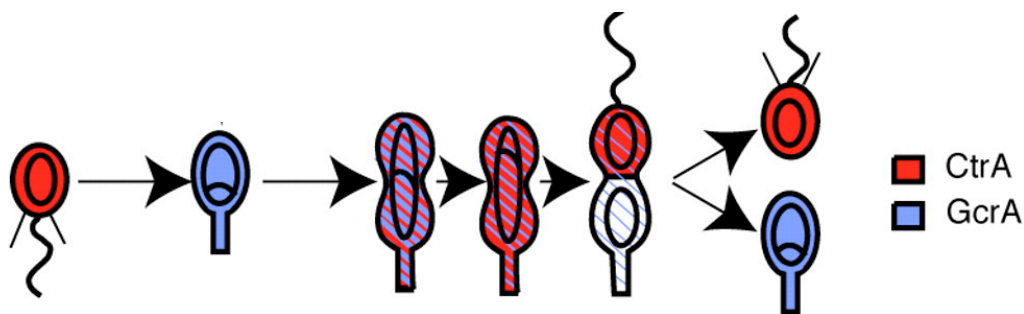


Figure 15: Représentation schématique du cycle cellulaire de *C. crescentus* avec la présence relative des protéines CtrA et GcrA représentée respectivement en rouge et en bleu. Image issue de (Holtzendorff et al., 2004).

C. Le tmRNA SsrA

SsrA marque de manière sélective les polypeptides naissants, principalement ceux traduits à partir d'ARN messagers incomplets, avec un tag qui les dirige vers la dégradation (Keiler et al., 1996). L'abondance de SsrA culmine lors de l'initiation de la réplication d'ADN chez *C. crescentus* et les cellules dépourvues de *ssrA* présentent un retard dans l'initiation de la réplication (Keiler and Shapiro, 2003a; Keiler and Shapiro, 2003b). Le rôle précis de SsrA à ce niveau n'est pas encore élucidé mais il pourrait intervenir dans le contrôle de l'abondance de DnaA, protéine requise pour initier la réplication d'ADN.

2.2.3. La chorégraphie des chromosomes néo-synthétisés

Une fois la réplication d'ADN initiée, une série de processus complexes sont mis en place pour continuer et terminer la réplication, ainsi que pour séparer les chromosomes dupliqués dans les deux compartiments correspondant aux futures cellules filles. De récentes données ont permis de nous rendre compte de l'organisation spatiale et temporelle que subissent ces chromosomes chez *C. crescentus*. Tout d'abord le chromosome de *C. crescentus* est orienté dans cette bactérie (Figure 16). Au sein de la cellule pédonculée, l'*oriC* est localisée au pôle pédonculé et la région de terminaison (*ter*) de la réplication est quant à elle localisée au pôle opposé. Lorsque la réplication est initiée, le premier élément dupliqué est l'*oriC*. Alors qu'une *oriC* reste au pôle pédonculé, sa copie migre vers le pôle opposé et la région *ter* se déplace progressivement au cours de l'élongation vers le centre cellulaire. Il en résulte qu'à la fin de la réplication, les deux *oriC* sont localisées aux deux pôles, pédonculé et flagellé, alors que les régions *ter* se situent aux nouveaux pôles, issus de l'événement de division bactérienne. Les deux cellules filles produites, la cellule flagellée et la cellule pédonculée, présentent donc chacune un chromosome orienté dans l'espace, l'*oriC* et le *ter* étant aux pôles, et les loci positionnés le long du grand axe de la bactérie de façon linéaire correspondant à leur position sur la carte physique du chromosome (Viollier et al., 2004).

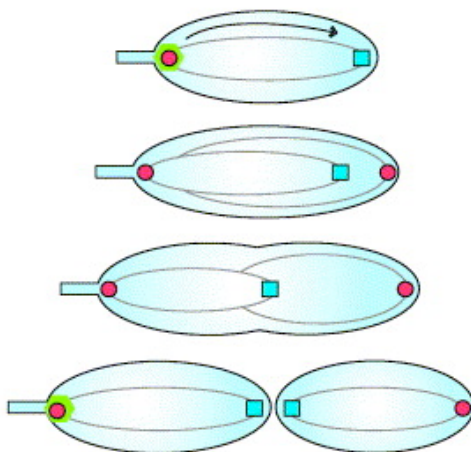


Figure 16: Organisation dynamique du chromosome de *C. crescentus* dans les deux types cellulaires, la cellule pédonculée et la cellule flagellée. L'origine de réplication (*oriC*), la région de terminaison (*ter*) et le réplisome sont respectivement représentées en rouge, bleu, et vert .Image issue de (Gitai et al., 2005).

2.2.4. Différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée

La cellule flagellée suit un programme de différenciation bien précis. Outre la synthèse et l'assemblage du flagelle au pôle, quatre étapes successives constituent le programme de différenciation de ce type cellulaire (Figure 17): (i) activation de la rotation du flagelle, (ii) éjection du flagelle, (iii) rétraction des pili et (iv) biogenèse du pédoncule au pôle préalablement occupé par le flagelle. Le checkpoint induisant ce programme de différenciation est assuré par un régulateur de réponse monodomaine, DivK (Matroule et al., 2004; Ohta et al., 2000). Plus précisément, c'est la déphosphorylation et de ce fait la délocalisation de DivK au pôle flagellé qui induit le programme de différenciation de la cellule flagellée (voir points suivants).

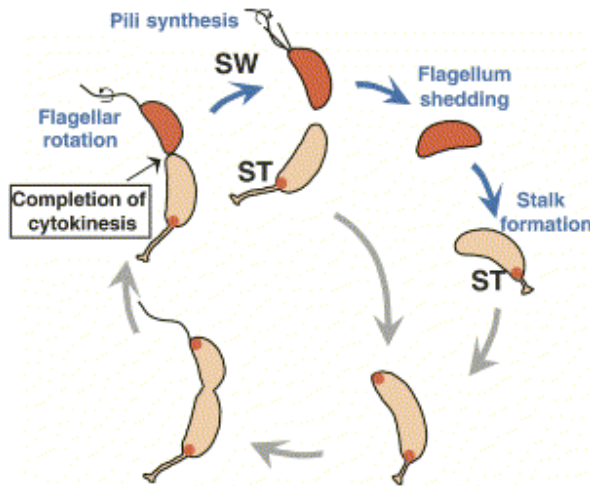


Figure 17: Programme de développement de la cellule flagellée comportant quatre étapes majeures (indiquées en bleu). Image issue de (Matroule et al., 2004).

3. Importance des systèmes à deux composants dans la régulation de la différenciation bactérienne

La différenciation bactérienne illustrée ci-dessus au moyen de deux exemples est, dans les deux cas, contrôlée par un système complexe de transduction du signal impliquant plusieurs composants.

3.1. Les deux composants en question

Les systèmes de transduction du signal à deux composants sont couramment retrouvés chez les bactéries mais également chez les champignons et les plantes. Ils sont utilisés par ces organismes pour répondre à des stimuli environnementaux ou intracellulaires (Hoch and Silhavy, 1995). Les deux composants en question sont les histidine kinases (HK) et les régulateurs de réponse (RR). Comme illustré sur la figure 18, en réponse à un stimulus, l'HK dimérise et s'autophosphoryle sur un résidu histidine (His) bien conservé. Ce groupement phosphoryle sera ensuite transféré sur un résidu aspartate (Asp) du RR. Cette transphosphorylation entre protéines est catalysée par le RR. Ce RR est composé d'au moins deux domaines principaux, un domaine régulateur (comportant l'Asp conservé) et un domaine effecteur. Ce dernier est souvent un domaine de liaison à l'ADN, faisant du RR un facteur de transcription. En d'autres termes, la perception d'un stimulus par une HK entraîne une voie de phosphorylation qui aboutit à l'activation d'un RR, lui-même initiant un programme de transcription spécifique qui permet à l'organisme d'apporter une réponse adaptée au stimulus perçu. A côté de ce système canonique, il existe également des systèmes à plusieurs composants comportant plusieurs intermédiaires protéiques mais toujours basés sur le même principe de phosphorelais (His → Asp). Dans ce cas de figure, le groupement phosphoryle passe d'une HK (His1) vers un premier RR (Asp1), puis vers une histidine phosphotransférase (His2) et vers un RR final (Asp2). Le nombre de relais His-Asp peut être supérieur à 2. Enfin, le domaine régulateur du RR peut également se retrouver à l'extrémité C-terminale de certaines HK. On parle dans ce cas d'HK hybrides. Ce genre d'HK effectue le premier transfert de groupement phosphoryle intramoléculairement (His1 → Asp1).

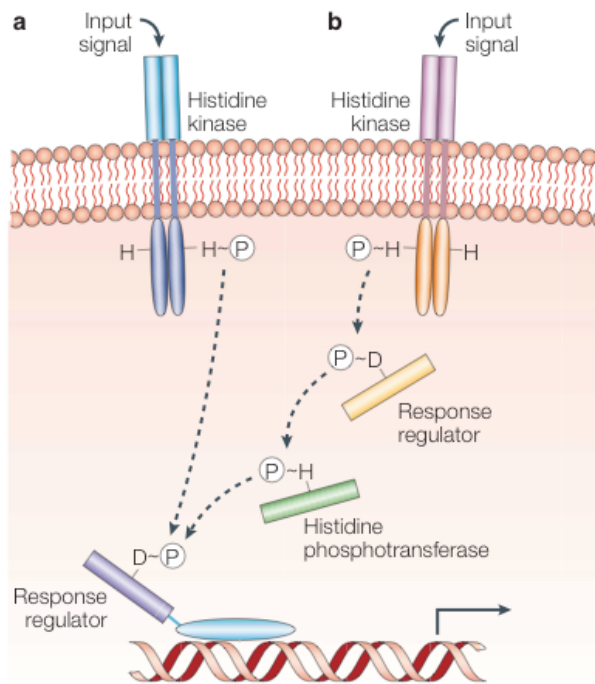


Figure 18: Systèmes de transduction à deux (a) ou à plusieurs composants (b). Image issue de (Skerker and Laub, 2004).

3.2. Sporule-sporule pas, voie de phosphorylation menant à la sporulation chez *B. subtilis*

3.2.1. Le régulon de Spo0A chez *B. subtilis*, un régulateur de réponse central

Une fois activé par phosphorylation, Spo0A-P est capable de se lier à une séquence *cis* de 7 bp (TGnCGAA) et d'induire ou de réprimer l'expression de gènes nécessaires à l'initiation de la sporulation. Cette séquence *cis* se retrouve dans des promoteurs reconnus par les facteurs sigma végétatif et alternatif, σ^A et σ^H respectivement. L'expression de plus de 500 gènes est sous le contrôle de Spo0A, ce qui représente un huitième du génome de *B. subtilis* (Fawcett et al., 2000). Plus précisément, Spo0A contrôle directement l'expression de 121 gènes, dont approximativement un tiers est induit et le reste réprimé. Parmi ces 121 gènes, 25 encodent des régulateurs expliquant l'impact global de Spo0A sur près de 13% du génome de *B. subtilis* (Molle et al., 2003). Plusieurs loci *spo* sont induits par Spo0A induisant la cascade d'initiation de la sporulation. Parmi ceux-ci, nous retrouvons *spoIIA* et *spoIIG*, encodant respectivement les facteurs σ^F et σ^E ; *spoIIE* encodant une phosphatase requise notamment pour l'activation de σ^F ; et *racA* encodant l'effecteur de formation du filament axial. En d'autres termes, Spo0A active la synthèse de facteurs impliqués dans le remodelage du chromosome, la division asymétrique et l'expression compartimentalisée de gènes.

phosphorelais à différents niveaux dans la voie de phosphorylation. Ainsi, Spo0F peut être déphosphorylé par les protéines Rap (A, B et E). Initialement considérées comme des phosphatases spécifiques, ces protéines semblent interagir avec Spo0F et induire son activité phosphatase intrinsèque. Ces liaisons sont contrôlées notamment par des pentapeptides, phéromones renseignant la population sur l'état de la densité cellulaire (Figure 20) (Core and Perego, 2003). En d'autres termes, RapA se dissocie de Spo0F en présence de pentapeptides, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'état de phosphorylation de Spo0F, et donc celui de Spo0A (Ishikawa et al., 2002). Spo0A lui-même peut être déphosphorylé par Spo0E, et deux de ces homologues, YisI et YnzD (Figure 20) (Perego, 2001). Les protéines Rap sont l'une des clés de l'enclenchement de la sporulation puisque dans une population en phase stationnaire, KinA s'accumule en même temps que les protéines Rap et Spo0E. La présence de ces protéines a pour conséquence que le taux de phosphorylation de Spo0F par KinA est annihilé par l'activité phosphatase induite par les protéines Rap. Pour que Spo0A soit effectivement phosphorylé, il faut que les protéines Rap soient antagonisées par les pentapeptides (Perego, 1998).

Un autre mécanisme de contrôle se situe au niveau de la concentration en GTP et GDP qui est critique pour l'initiation de la sporulation. CodY joue un rôle central dans ce mécanisme en tant que senseur du niveau de GTP, puisqu'en présence d'une faible concentration en GTP, CodY lève la répression des gènes *phrA*, *phrE* et *kinB*. Alors que les pentapeptides contrôlant l'activité de RapA, RapB et RapE sont dérivés du processing des protéines exportées PhrA et PhrE, KinB constitue une des 5 HK régulant le niveau de phosphorylation de Spo0F. CodY joue dès lors un rôle central dans la voie de phosphorylation de Spo0A contrôlant le flux de phosphate à différents niveaux en fonction de la concentration en GTP (Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001).

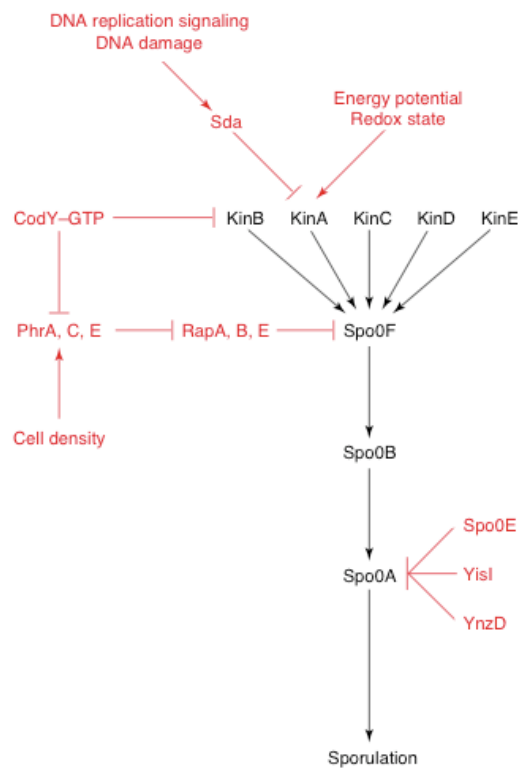


Figure 20: Phosphorelais activant Spo0A. Image issue de (Piggot and Hilbert, 2004).

B. Contrôle transcriptionnel de spo0A et de gènes impliqués dans le phosphorelais de Spo0A

Les gènes *spo0A* et *spo0F* possèdent deux promoteurs, l'un reconnu par l'ARN polymérase complexée au facteur σ^A qui permet un niveau d'expression basal en croissance végétative, et l'autre spécifiquement induit lors de l'entrée en phase stationnaire. Ces seconds promoteurs, essentiels à l'initiation de la sporulation, sont reconnus par l'ARN polymérase complexée au facteur σ^H . Le gène *spo0H* qui encode le facteur σ^H est réprimé par le répresseur AbrB (Weir et al., 1991). Le facteur σ^H est présent en très faible quantité dans une population à faible densité cellulaire. D'autre part, Spo0A réprime l'expression de *abrB* (Figure 19). Sachant que AbrB réprime *spo0H*, Spo0A-P s'autoinduit par l'intermédiaire de *abrB*. L'expression de *spo0A* est également réprimée par SinR, une protéine tétramérique synthétisée constitutivement. Cette répression est levée par SinI, une protéine induite en phase stationnaire qui se lie à SinR (Bai et al., 1993). SinI forme un complexe 1:1 avec les monomères de SinR, ce qui empêche la formation d'un tétramère actif de SinR (Scott et al., 1999). Comme indiqué plus haut, les protéines Spo0J et Soj sont indispensables à la partition des chromosomes entre la cellule mère et la préspore en formation. Durant la sporulation, ces protéines contrôlent également l'expression des gènes dépendants de Spo0A, ainsi que le gène *spo0A* lui-même (Cervin et al., 1998a; Cervin et al., 1998b; Quisel and Grossman, 2000). En fait, Soj réprime l'expression notamment de *spo0A* alors que Spo0J antagonise cette répression. Il semblerait que les deux fonctions assurées par Spo0J/Soj (ségrégation des chromosomes et répression transcriptionnelle) soient intimement liées. Il est en effet possible que les chromosomes répliqués migrent vers les pôles via leurs origines de réplication, ce qui entraînerait Spo0J, et indirectement titrerait Soj des régions promotrices de gènes spécifiques de sporulation. Un tel mécanisme permettrait de coupler l'initiation de la sporulation à la ségrégation des chromosomes.

3.3. Nage-nage pas, les phosphorelais contrôlant la mobilité et la synthèse du pédoncule de *C. crescentus*

Parmi les différents checkpoints impliqués dans la coordination des événements liés au cycle cellulaire et au développement de *C. crescentus*, l'un d'entre eux a été particulièrement bien étudié. Celui-ci est constitué d'un phosphorelais complexe contrôlant l'activité de deux régulateurs centraux, DivK et CtrA.

3.3.1. Le régulon de CtrA chez *C. crescentus*, un régulateur de réponse global

Le profil d'expression des quelques 3800 gènes de *C. crescentus* a été évalué au moyen de DNA microarrays sur une population synchronisée de *C. crescentus*. Ces études ont permis de montrer qu'approximativement 19% des 2966 gènes testés, soit 553 gènes, montrent un profil d'expression dépendant du cycle cellulaire. En d'autres termes, la transcription de ces 553 gènes varie d'un facteur supérieur ou égal à deux, d'une manière cyclique durant l'équivalent d'un cycle cellulaire de *C. crescentus* (Laub et al., 2000). Une approche similaire a également permis de montrer qu'un peu plus du quart de ces 553 gènes sont sous le contrôle du RR CtrA (Laub et al., 2000; Quon et al., 1996). Ce RR comporte un domaine de liaison à l'ADN lui permettant d'induire ou de réprimer directement l'expression de 55 opérons chez *C. crescentus*, ce qui représente 95 gènes (Laub et al., 2002). Parmi les cibles directes de CtrA, on retrouve des gènes impliqués dans la division cellulaire, la méthylation de l'ADN, la biogenèse du flagelle, la biosynthèse des pili, le chémotactisme et le métabolisme (Figure 12). Une étude protéomique a confirmé les résultats obtenus grâce aux

damiers à ADN (Grunenfelder et al., 2001). CtrA lie deux séquences *cis* caractéristiques, TTAA-N₇-TTAAC et TTAACCAT. Alors que la première de ces séquences *cis* était connue avant même que *ctrA* lui-même ne soit identifié, la seconde fut identifiée grâce à des expériences d'immunoprécipitation d'ADN chromosomique lié par CtrA (Laub et al., 2002). Parmi les 95 gènes régulés par CtrA, le gène *hemE* a une importance capitale. En effet, ce gène est situé à hauteur de l'*oriC* du chromosome de *C. crescentus*. La liaison de CtrA à cinq éléments *cis* au niveau du promoteur de *hemE* a pour conséquence d'inhiber l'initiation de la réplication d'ADN comme indiqué plus haut (Marczynski et al., 1995; Marczynski and Shapiro, 1992).

En contrôlant la morphogenèse polaire d'une part, et l'initiation de la réplication ainsi que la division bactérienne d'autre part, CtrA coordonne la progression de ces événements distincts. Donc, le contrôle de CtrA, qui détermine quand et dans quel type cellulaire ces événements doivent être induits, est critique pour *C. crescentus*.

3.3.2. Les multiples mécanismes contrôlant CtrA dans l'espace et dans le temps

Trois mécanismes contrôlant CtrA ont été identifiés à ce jour. Il s'agit de la transcription du gène *ctrA* à partir de deux promoteurs, l'activation de la protéine CtrA par phosphorylation d'un aspartate conservé, et la dégradation protéolytique de CtrA. Ces trois mécanismes permettent conjointement d'activer ou de réprimer l'activité de CtrA dans différents compartiments cellulaires et à différents moments du cycle cellulaire (Figure 21).

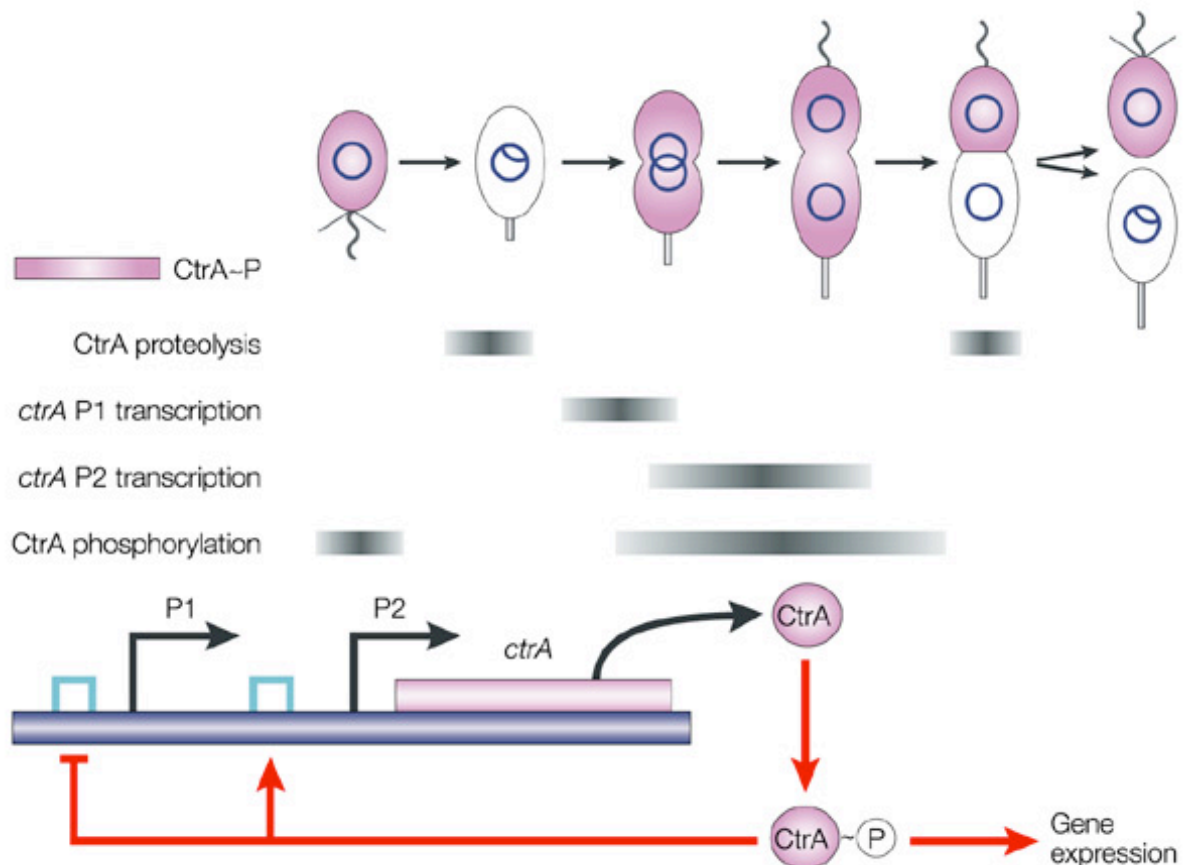


Figure 21: Régulation spatiale et temporelle du régulateur de réponse CtrA. La présence de la forme phosphorylée de CtrA dans les différents types cellulaires et à différents moments du cycle cellulaire est représentée en rose. Les trois mécanismes contrôlant l'activité de CtrA (protéolyse, transcription de *ctrA* à partir des promoteurs P1 et P2 et phosphorylation) sont actifs à différents moments du cycle cellulaire, comme indiqué par les barres horizontales grises. Image issue de (Skerker and Laub, 2004).

A. La transcription de ctrA

Deux promoteurs contrôlent l'expression de *ctrA*, appelés P1 et P2. Le promoteur P1 présente une activité faible initiant une transcription basale de *ctrA* en début de phase S (juste après l'initiation de la réplication d'ADN). Au fur et à mesure que la concentration de CtrA augmente, CtrA se lie et réprime le promoteur P1 tout en activant fortement le promoteur P2 (Domian et al., 1999). Cette boucle de rétroaction positive a pour conséquence d'augmenter drastiquement la concentration de CtrA au cours de la réplication du chromosome de *C. crescentus*. En plus des deux sites de liaison de CtrA qui permettent à celui-ci de réprimer et d'activer les promoteurs P1 et P2, respectivement, il existe des sites de méthylation de l'ADN (de séquence GAnTC) reconnus et méthylés par l'ADN méthyltransférase CcrM. L'un de ces sites de méthylation a une importance capitale dans l'initiation de la transcription à partir du promoteur P1 *ctrA* dans la cellule pédonculée (Figure 21). En effet, ce site situé entre les boîtes -35 et -10 de P1, modifie la force du promoteur P1 en fonction de son état de méthylation, puisqu'une fois méthylé ce site réduit la force de P1 (Reisenauer and Shapiro, 2002). Rappelons que le gène encodant CcrM est lui-même sous le contrôle de CtrA. Cette relation transcriptionnelle entre produits de gènes permet d'initier la transcription de *ctrA* à un moment précis du cycle cellulaire. Juste avant que la réplication d'ADN ne soit initiée, le chromosome, incluant le locus *ctrA*, est sous une forme complètement méthylée. A ce moment du cycle cellulaire, *ctrA* n'est donc pas exprimé. En cours de réplication d'ADN, la fourche de réplication passe par le locus *ctrA*, ce qui génère deux copies du locus *ctrA* chacune étant hémi-méthylée, en accord avec le modèle de réplication semi-conservative. C'est donc à cet instant précis que *ctrA* est exprimé à partir du promoteur P1. Un peu plus tard dans le cycle cellulaire (au stade prédivisionnel), CtrA atteint une concentration suffisante qui, une fois phosphorylé (cfr plus bas) activera l'expression du gène *ccrM*, qui encode l'ADN méthyltransférase responsable de la méthylation du chromosome. Cette méthylation aura pour conséquence d'inhiber la transcription de *ctrA* à partir de P1. Cette inhibition de transcription à partir de P1 permettra notamment d'éviter que CtrA ne soit produit dans le compartiment pédonculé de la cellule prédivisionnelle. Comme illustré ci-après, la dégradation protéolytique de CtrA dans ce compartiment cellulaire, couplée à l'absence de transcription de *ctrA* permettra de libérer une cellule pédonculée dépourvue de CtrA.

B. La protéolyse de CtrA

L'une des clés dans la génération de deux cellules filles morphologiquement et fonctionnellement différentes réside dans la distribution asymétrique de CtrA dans la cellule prédivisionnelle (Figure 21). En effet, la compartimentalisation de CtrA uniquement dans la future cellule flagellée aura comme conséquences, d'une part d'initier la cascade flagellaire dans le compartiment flagellé, et d'autre part de permettre à la future cellule pédonculée complètement dépourvue de CtrA d'initier immédiatement un nouveau cycle de réplication d'ADN. Cette compartimentalisation de CtrA nécessite notamment le complexe protéolytique

ClpXP (Jenal and Fuchs, 1998). Cette protéase reconnaît typiquement des résidus hydrophobes présents à l'extrémité C-terminale des substrats protéiques. C'est donc sans surprise que la modification des deux derniers résidus de CtrA (Ala-Ala) par deux résidus asparte (Asp-Asp) abolit la dégradation de CtrA par ClpXP (Domian et al., 1997). Bien que ces deux résidus alanine soient indispensables pour la reconnaissance de CtrA par ClpXP, ils ne sont pas pour autant suffisants. En effet, les 56 premiers résidus de CtrA constituant le domaine receveur (RD), ainsi que les 15 derniers comprenant les deux alanines, sont suffisants pour provoquer la dégradation spécifique par ClpXP (Ryan et al., 2002).

En plus de la séquence-même de CtrA, un adaptateur de protéolyse a été identifié chez *C. crescentus*. Cet adaptateur, RcdA, a pour rôle de médier la protéolyse notamment de CtrA par ClpXP. Cette protéine interagit physiquement avec ClpX et avec CtrA (McGrath et al., 2006). De manière plus surprenante, CtrA, RcdA et le complexe ClpXP colocalisent à un pôle de *C. crescentus* à différents moments du cycle cellulaire, plus précisément au pôle préalablement occupé par le flagelle lors de la différenciation cellulaire et au pôle pédonculé de la cellule prédivisionnelle tardive (Figure 22). Cette localisation polaire précède dans les deux cas la protéolyse de CtrA. Un autre acteur est impliqué dans le contrôle de la dégradation de CtrA, en contrôlant cette fois la localisation des complexes ClpXP aux pôles adéquats. Cet acteur, CpdR, est un RR qui sous sa forme déphosphorylée est localisé au pôle préalablement occupé par le flagelle lors de la différenciation cellulaire et au pôle pédonculé de la cellule prédivisionnelle tardive. En interagissant physiquement avec les complexes ClpXP, CpdR va dès lors recruter ces complexes aux mêmes pôles, et ainsi permettre la dégradation reproductible, dans l'espace et dans le temps, de CtrA au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus* (Iniеста et al., 2006). Comme indiqué ci-dessus, c'est la forme déphosphorylée de CpdR qui localise aux pôles et y recrute ClpXP. Cette caractéristique a pour conséquence qu'un mutant non-phosphorylable (CpdRD51A) est constamment localisé aux pôles de *C. crescentus*. D'autre part, ce mutant va également recruter constamment ClpXP aux pôles et de ce fait accélérer la dégradation de CtrA (Iniеста et al., 2006).

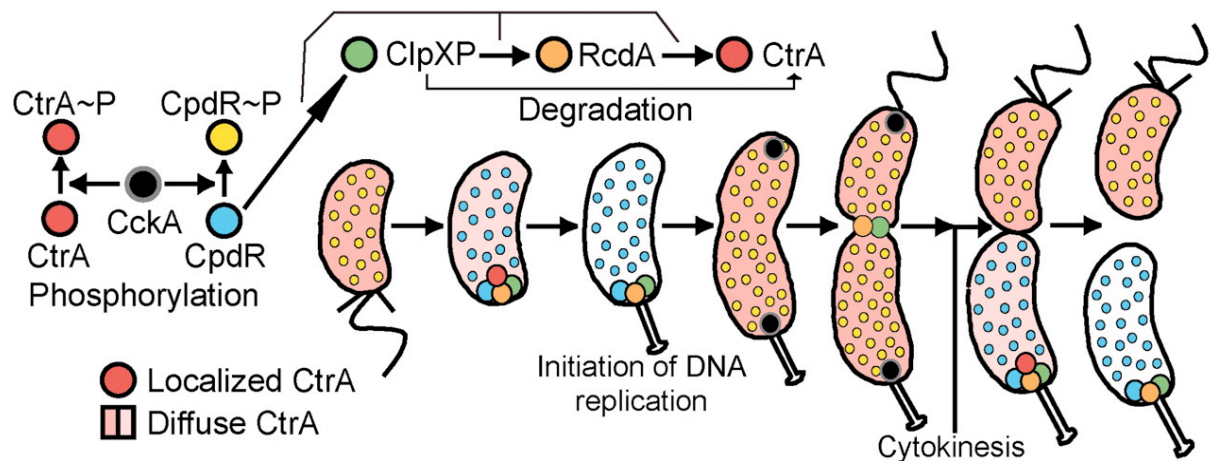


Figure 22: Contrôle de la dégradation protéolytique de CtrA par l'adaptateur de protéolyse RcdA et le RR CpdR. Voir texte pour les détails. Image issue de (Iniеста et al., 2006).

Ces quelques dernières lignes permettent de comprendre comment CtrA est dégradé par une protéase spécifique, par exemple lors de la différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée. Mais comment expliquer la protéolyse de CtrA uniquement dans le compartiment pédonculé de la cellule prédivisionnelle ? Un premier élément de réponse réside dans le fait

que la protéolyse de CtrA ne s'initie qu'après la formation d'un septum fonctionnel, séparant physiquement les deux compartiments cytoplasmiques (Judd et al., 2003).

Etant donné le contrôle négatif qu'exerce CtrA sur la réplication d'ADN, nous pourrions nous attendre à ce que la dégradation protéolytique de CtrA soit essentielle. Au contraire, la protéolyse de CtrA à elle seule n'est pas essentielle puisque des mutants de *ctrA* qui ne sont pas dégradés supporte parfaitement la viabilité (Domian et al., 1997). Cette caractéristique s'explique par le fait que CtrA puisse être déphosphorylé et donc inactivé (voir plus bas). Cette déphosphorylation, dont l'acteur responsable reste inconnu à ce jour, n'est pas non plus à elle seule essentielle, puisqu'à nouveau un mutant *ctrAD51E* mimant un état phosphorylé constitutif est viable. Par contre, la protéolyse et la déphosphorylation constituent ensemble un caractère essentiel de CtrA. En effet, un allèle mutant de *ctrA* encodant une protéine non protéolysée et mimant une phosphorylation constitutive a un effet dominant négatif sur l'allèle sauvage de *ctrA* (Domian et al., 1997).

C. La phosphorylation de CtrA

En tant que RR de système de transduction du signal à deux composants, CtrA est phosphorylé sur un aspartate conservé (Asp 51). Cette phosphorylation modifie l'affinité de CtrA pour l'ADN, et donc implicitement la capacité de CtrA à contrôler l'expression de gènes placés sous sa dépendance (Siam and Marczyński, 2003). Cette phosphorylation de CtrA varie au cours du cycle cellulaire (Figure 21). En résumé, CtrA est présent et phosphorylé dans la cellule flagellée, puis disparaît lors de la différenciation en cellule pédonculée, avant d'être à nouveau phosphorylé dans la cellule prédivisionnelle. Pas moins de trois phosphorelais en amont de CtrA ont été identifiés et seront présentés en détails dans les paragraphes suivants.

LA VOIE DE PHOSPHORYLATION DEPENDANTE DE CCKA

Le premier phosphorelais aboutissant à la phosphorylation de CtrA contient l'histidine kinase hybride CckA, essentielle à la viabilité de *C. crescentus* (Jacobs et al., 2003; Jacobs et al., 1999). En effet, CtrA n'est plus, ou très peu, phosphorylé dans un mutant conditionnel de *cckA* (Jacobs et al., 1999). Les phénotypes développés par ce mutant ressemblent fortement à ceux développés par un mutant conditionnel de *ctrA*, à tel point que plus de 90% des gènes dont l'expression est régulée par CtrA présentent un profil d'expression modifié dans le mutant *cckA* (Jacobs et al., 2003). Cette « phénocopie » suggère que l'ensemble, ou une grande partie, des fonctions de CckA passent par CtrA. Cette hypothèse fut démontrée *in vivo*, puisque l'essentialité de *cckA* devient dispensable dans un background contenant comme seule copie de *ctrA* une version mimant un état constitutivement phosphorylé (*ctrAD51E*) (Jacobs et al., 2003). En outre, le profil de phosphorylation de CckA au cours du cycle cellulaire suit parfaitement celui de CtrA, ce qui suggère que CckA pourrait phosphoryler CtrA aux différents moments du cycle cellulaire (Jacobs et al., 2003). Enfin, CckA fut l'une des premières HK décrites chez *C. crescentus* à présenter un profil de localisation dynamique au cours du cycle cellulaire (Figure 24). En effet, CckA est localisé préférentiellement au pôle flagellé, et ce dès le stade prédivisionnel précoce, donc bien avant la biogenèse même du flagelle. Cette localisation s'accorde bien avec la fonction qu'assure CckA, à savoir phosphoryler CtrA, qui doit être activé dans la cellule flagellée. Bien que la phosphorylation de CtrA dépende, au moins partiellement, de CckA, ce transfert de groupement phosphate doit nécessairement faire intervenir un troisième acteur, plus précisément une histidine phosphotransférase (Hpt). En effet, en tant que histidine kinase hybride, CckA s'autophosphoryle au niveau d'une histidine (His) et

transfère intramoléculairement ce groupement phosphoryle sur un résidu aspartate (Asp) présent dans le domaine régulateur. Avant d'aboutir sur l'Asp 51 de CtrA, ce groupement phosphoryle devrait au préalable passer par une Hpt. Cette Hpt vient d'être identifiée par le groupe de Michael Laub et porte le nom de ChpT (Biondi et al., 2006). Comme attendu, le groupement phosphoryle passe de l'His de CckA à l'Asp de son domaine receveur, et transite par ChpT pour aboutir à CtrA (Figure 23). De manière surprenante, ce groupement phosphoryle transitant par ChpT aboutit également à un autre RR que CtrA, qui n'est rien d'autre que CpdR (Biondi et al., 2006). Pour rappel, CpdR sous sa forme déphosphorylée stimule la localisation polaire de ClpXP et de ce fait la dégradation protéolytique de CtrA. Donc le phosphorelais initié à partir de CckA mène non seulement à la phosphorylation de CtrA mais le protège également de sa dégradation protéolytique en inactivant CpdR par phosphorylation. Ce double transfert de groupement phosphoryle (CckA-ChpT-CtrA et CckA-ChpT-CpdR) explique le caractère essentiel de CckA. En effet, comme illustré plus haut, la déphosphorylation (ou la non-phosphorylation) et la protéolyse de CtrA ensemble sont essentielles à la survie de *C. crescentus*. Puisque le phosphorelais dépendant de CckA contrôle simultanément ces deux mécanismes, cela explique les raisons pour lesquelles le gène *cckA* est essentiel. Dans un mutant de *cckA*, CtrA n'est plus phosphorylé et est constitutivement protéolysé.

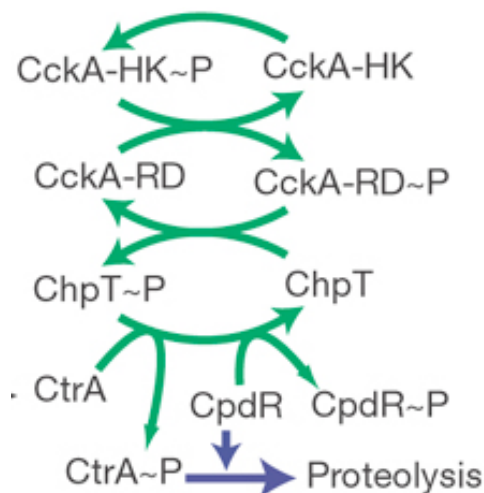


Figure 23: Phosphorylation de CtrA et de CpdR par le phosphorelais CckA-ChpT. Image adaptée de (Biondi et al., 2006).

DIVL, UNE HISTIDINE KINASE ATYPIQUE

DivL est une autre HK génétiquement liée à CtrA. Un allèle *ts* de *divL* génère des phénotypes similaires aux mutants *ctrA ts* en conditions restrictives (Wu et al., 1999). De plus, les phénotypes d'un allèle *cs* de *divL* sont complètement supprimés par un allèle *ts* de *ctrA* (l'allèle *sokA*). En outre, bien qu'aucune donnée de phosphorylation *in vivo* ne soit disponible, DivL est capable de phosphoryler CtrA *in vitro* (Wu et al., 1999). L'aspect atypique de DivL vient du fait que cette HK s'autophosphoryle sur un résidu Tyr (Tyr550) plutôt que sur un résidu His classique. L'organisation en domaine étant parfaitement conservée par rapport aux autres HK, DivL est considéré comme une véritable HK et non une tyrosine kinase. Ce résidu Tyr est critique pour les fonctions essentielles de DivL, en ce sens que la substitution de cette Tyr par une Ala ne supporte pas la viabilité comme seule copie (Wu et al., 1999). A l'instar de CckA, DivL présente également un profil de localisation dynamique. Bien que les données de localisation soient peu claires, il semblerait que la localisation de DivL coïncide avec celle de CckA, ce qui appuie l'hypothèse que ces deux HK phosphorylent CtrA (Sciochetti et al., 2005). Pour terminer, un crible double-hybride réalisé sur une banque d'ADN génomique de *C. crescentus* en utilisant le RR DivK comme appât (voir

plus bas) a permis de mettre en évidence une interaction entre DivL et DivK (Ohta and Newton, 2003). Cependant, DivL étant incapable de phosphoryler DivK *in vitro*, la relevance fonctionnelle de l'interaction DivK avec DivL reste obscure.

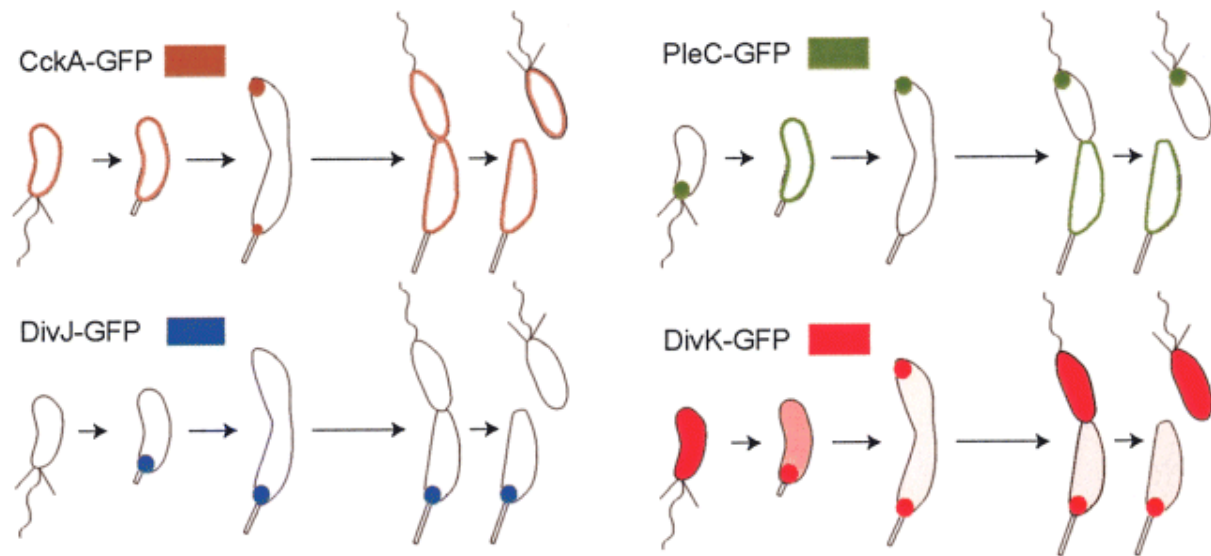


Figure 24: Schémas décrivant la localisation des HK CckA, DivJ, PleC et du RR DivK au cours du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Image issue de (Jacobs-Wagner, 2004).

LE MENAGE A 3, DIVJ-PLEC-DIVK

Le troisième phosphorelais en amont de CtrA contient trois acteurs, le RR essentiel DivK et les deux HK non essentielles DivJ et PleC. Ces trois acteurs se situent en amont de CtrA puisque l'allèle *sokA* de *ctrA* est capable de supprimer les phénotypes d'allèles mutants pour chacun des gènes *divK*, *divJ* ou *pleC* (Sciocchetti et al., 2002; Wu et al., 1998a). Initialement, *divJ* et *divK* furent identifiés au cours d'un crible génétique de suppression extragénique puisque des allèles mutants de ces deux gènes suppriment le phénotype ts d'immobilité d'un mutant *pleC* à 37°C tout en conférant un défaut de division cellulaire à 24°C (Sommer and Newton, 1991). L'idée des auteurs à l'époque était qu'il devait exister des régulateurs de la division cellulaire qui contrôlent certains événements de la morphogénèse puisque le blocage de *C. crescentus* à des stages précoces du cycle cellulaire engendre des bactéries non pédonculées et possédant un flagelle immobile (Huguenel and Newton, 1982). Etant donné qu'un mutant *pleC* ts correspond à cette description, à savoir qu'il génère à 37°C des bactéries non pédonculées et possédant un flagelle immobile, la sélection de suppresseurs mobiles et pédonculés à 37°C qui présentent un défaut de cycle cellulaire à basse température a permis d'isoler des candidats pour le checkpoint en question. Des données biochimiques ont ensuite confirmé que ces trois protéines interagissent ensemble pour constituer une voie de phosphorylation.

PleC est une HK liée à la membrane qui contrôle la différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée (plus précisément du pôle flagellé en pôle pédonculé) (Sommer and Newton, 1989; Wang et al., 1993). En effet, les fonctions de PleC sont requises pour activer la rotation du flagelle en réponse à l'achèvement de la cytokinèse dans la cellule prédivisionnelle (Burton et al., 1997), mais également pour tous les événements consécutifs à l'activation du flagelle au cours de la différenciation du pôle flagellé, à savoir la formation des pili, l'éjection du flagelle, la rétraction des pili et la biogénèse du pédoncule (Sommer and Newton, 1989; Sommer and Newton, 1991). Tous ces événements caractérisent la différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée comme indiqué plus haut. Puisque

PleC contrôle la différenciation de *C. crescentus*, il en résulte qu'un mutant *pleC* génère des cellules prédivisionnelles d'apparence symétrique, avec des flagelles immobiles à chaque pôle.

DivJ est également une HK membranaire dont les fonctions sont requises pour le contrôle de la longueur du pédoncule et l'initiation de la division cellulaire (Ohta et al., 1992). Dès lors un mutant *divJ* bien que parfaitement viable génère des bactéries allongées avec de longs pédoncules mal positionnés.

DivK est un petit RR monodomaine essentiel à la survie de *C. crescentus* (Hecht et al., 1995). Contrairement à la plupart des RR, DivK ne comporte que le domaine régulateur et est donc dépourvu de tout domaine effecteur. Ce type de RR transmet le signal soit via des interactions protéine-protéine, soit en transitant un groupement phosphorylé d'une His vers une autre His. Des mutants conditionnels de *divK* présentent des phénotypes pléiotropiques dans la morphogénèse et la division cellulaire, tels que la formation anormale du pédoncule, une filamentation sévère, un blocage dans l'initiation de la réplication d'ADN qui mènent irrémédiablement à la mort cellulaire de *C. crescentus* (Hecht et al., 1995; Hung and Shapiro, 2002).

DivJ et PleC ont été initialement proposés comme deux HK phosphorylant DivK (Hecht et al., 1995; Ohta et al., 1992). Cependant, les HK peuvent non seulement phosphoryler mais aussi déphosphoryler leur RR. Des tests de phosphorylation *in vivo* ont permis d'observer que le niveau de phosphorylation de DivK est amoindri dans un mutant *divJ* mais augmenté dans un mutant *pleC*, suggérant que DivJ phosphoryle DivK mais que PleC inhibe cette phosphorylation ou déphosphoryle DivK (Wheeler and Shapiro, 1999). Plus récemment, des données biochimiques et génétiques ont permis de démontrer que *in vivo*, DivJ agit comme une kinase de DivK et PleC comme une phosphatase de DivK (Matroule et al., 2004). PleC est également capable de contrôler l'état de phosphorylation d'un autre RR, PleD (Hecht and Newton, 1995; Paul et al., 2004). Ce dernier est également impliqué dans le contrôle de la morphogénèse. En d'autres termes la voie PleC-DivK contrôle notamment l'activation de la rotation du flagelle alors que la voie PleC-PleD régule la perte du flagelle, deux événements liés à la différenciation de la cellule flagellée.

Le lien exact entre DivK et CtrA reste inconnu même si plusieurs éléments de réponse ont été récemment publiés. Deux hypothèses non exclusives existaient. DivK contrôlerait la phosphorylation ou la dégradation protéolytique de CtrA. Des données obtenues en 2002 ont démontré que CtrA n'est plus protéolysé dans un mutant conditionnel *divK* en conditions restrictives (Hung and Shapiro, 2002). Ce même mutant meurt suite à un blocage de la réplication d'ADN. Cependant, une version de CtrA non dégradée par ClpXP est viable, ce qui suggère que l'essentialité de *divK* ne peut être expliquée que par le seul contrôle de la protéolyse de CtrA. En effet, seule une version non protéolysable et non déphosphorylable mène à un blocage de la réplication d'ADN et à la mort cellulaire. Cette dernière remarque suggère que DivK doit probablement contrôler la protéolyse et la (dé)phosphorylation de CtrA. Une seconde étude récente propose que DivK contrôle bien ces deux mécanismes post-transcriptionnels en régulant la localisation, et donc la fonction, de CckA, l'HK contrôlant simultanément la protéolyse et la phosphorylation de CtrA (Biondi et al., 2006).

Etant donné l'implication de DivJ, PleC et DivK dans la différenciation des pôles de *C. crescentus*, nous pouvions nous attendre à ce que ces protéines se localisent aux pôles adéquats au cours du cycle cellulaire. Comme l'illustre la figure 24, c'est en effet le cas. Les HK DivJ et PleC présentent une localisation parfaitement opposée au cours du cycle cellulaire (Lam et al., 2003; Wheeler and Shapiro, 1999). DivJ localise au pôle pédonculé dès que le pédoncule y est présent, alors que la localisation de PleC est plus dynamique puisque celui-ci est localisé au pôle flagellé de la cellule flagellée, puis se délocalise lors de la différenciation en cellule pédonculée avant de coloniser le pôle opposé au pôle pédonculé. En d'autres

termes, ces deux HK sont localisées aux pôles où elles gouvernent les événements de différenciation, *i.e.* au pôle pédonculé pour DivJ qui contrôle la longueur du pédoncule et au pôle flagellé pour PleC qui contrôle l'activation de la rotation du flagelle ainsi que toutes les étapes successives de la différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée (Figure 24). La localisation polaire de DivJ et PleC ne dépend pas de leur capacité à s'autophosphoryler, puisque la mutation de leur His respective ne change pas leur profil de localisation (Lam et al., 2003). DivK présente quant à lui un profil de localisation dynamique qui correspond en partie aux localisations de DivJ et PleC (Figure 24). En effet, ce RR co-localise avec DivJ au pôle pédonculé et ce durant tout le cycle cellulaire, et co-localise avec PleC au pôle opposé au pôle pédonculé durant les phases précoces de la cellule prédivisionnelle (Jacobs et al., 2001; Lam et al., 2003). Cette localisation dynamique requiert la phosphorylation de DivK puisque d'une part un mutant non phosphorylable de DivK (DivKD53A) n'est localisé à aucun pôle durant le cycle cellulaire de *C. crescentus* (Lam et al., 2003), et d'autre part, DivK est complètement délocalisé dans un délétant *divJ* (Jacobs et al., 2001). De plus, en présence d'une version mutée non phosphorylable de DivJ (His muté en Ala), DivK est toujours capable de localiser au pôle pédonculé mais plus au pôle flagellé. (Lam et al., 2003). En outre, dans un mutant de délétion ou ponctuel (His en Ala) de *pleC*, DivK est localisé aux deux pôles de *C. crescentus* (Jacobs et al., 2001; Lam et al., 2003). En résumé, le suivi de la localisation de DivK dans les mutants de délétion ou non phosphorylable de *divJ* ou *pleC* ont permis de mettre en évidence les fonctions de ces deux HK : DivJ recrute DivK au pôle pédonculé au moyen d'interaction protéine-protéine, indépendamment de son activité kinase, et permet la localisation de DivK au pôle flagellé au travers de sa phosphorylation ; PleC quant à lui permet la délocalisation de DivK en modifiant son état de phosphorylation et ce avant l'achèvement de la division cellulaire (Lam et al., 2003). La relation PleC-DivK au pôle flagellé fut ensuite finement caractérisée et a permis de proposer un modèle de coordination entre des événements liés au cycle cellulaire et au développement de *C. crescentus* (Matroule et al., 2004). Rappelons que certains événements de développement de *C. crescentus* sont régulés en fonction d'étapes clés du cycle cellulaire. Comme illustré à la figure 13, l'activation de la rotation du flagelle dépend de la séparation des cellules filles (CS) en fin de division bactérienne (ce phénomène est également appelé cytokinèse). Plus que la rotation du flagelle, c'est l'ensemble des événements de différenciation de la cellule flagellée en cellule pédonculée, à savoir l'induction de la rotation du flagelle, l'éjection du flagelle, la rétraction des pili et la biogenèse du pédoncule, qui dépend de la cytokinèse (Huguenel and Newton, 1982; Matroule et al., 2004). Plusieurs données suggéraient que DivK constitue le checkpoint qui coordonne la rotation du flagelle à la cytokinèse chez *C. crescentus* : (i) DivK contrôle des événements liés à la division bactérienne puisqu'un mutant conditionnel de *divK* filamente en conditions restrictives ; (ii) des allèles *cs* de *divK* suppriment complètement l'immobilité de mutants *ts* de *pleC* ; et (iii) l'état de phosphorylation de DivK est régulé négativement par PleC et ces deux protéines co-localisent au pôle flagellé. Plus que DivK lui-même, ce serait le relargage de DivK du pôle flagellé qui activerait la rotation du flagelle. En effet, DivK se détache du pôle flagellé au moment où la cytokinèse s'achève et c'est précisément à ce moment que le flagelle entame sa rotation. De manière plus précise, voici les éléments qui ont permis de déterminer que le relargage de DivK du pôle flagellé constitue bien le checkpoint qui induit la rotation du flagelle ainsi que les autres événements de différenciation de la cellule flagellée, et ce en réponse à la cytokinèse. Premièrement, un mutant de *divK* qui supprime l'immobilité de mutants *pleC* n'est plus capable de se localiser au pôle flagellé, alors que la version sauvage de *divK* dans les mêmes mutants est localisée aux deux pôles à tout moment du cycle cellulaire (Matroule et al., 2004). Cette donnée nous indique que c'est la localisation constante de DivK au pôle flagellé dans les mutants de *pleC* qui inhibe la rotation du flagelle

ainsi que la différenciation de la cellule flagellée. De plus, la délocalisation de DivK du pôle flagellé dépend non seulement de la présence de *pleC*, mais également de la division bactérienne. En effet, en inhibant la division bactérienne, *C. crescentus* forme des filaments aux extrémités desquels on retrouve DivK localisé aux deux pôles (Matroule et al., 2004). Le modèle proposé par cette équipe est, par analogie, comparé à un jeu de ping-pong pour lequel DivJ et PleC, localisés aux pôles opposés, seraient les joueurs, et DivK la balle (Figure 25). La cytokinèse constituerait alors un mur infranchissable qui mettrait fin à la partie (Matroule et al., 2004). Résumons brièvement le mode de fonctionnement de ce modèle moléculaire. DivJ, grâce à ces deux fonctions dissociables, recrute DivK au pôle pédonculé, le phosphoryle et lui permet de se localiser au pôle flagellé. Au pôle flagellé, DivK-P interagit avec PleC et ce dernier, grâce à son activité phosphatase, déphosphoryle DivK-P. Les molécules de DivK déphosphorylées sont alors libérées du pôle flagellé et diffusent dans la cellule jusqu'à ce qu'elles soient à nouveau localisées au pôle pédonculé grâce à DivJ. Les activités antagonistes et les localisations opposées de la kinase DivJ et la phosphatase PleC permettent donc à DivK-P/DivK d'effectuer des allers-retours entre les deux pôles, tant que les cytoplasmes des deux compartiments de la cellule prédivisionnelle sont en communication. Lorsqu'en fin de division la cytokinèse s'achève, d'une part les molécules de DivK phosphorylées par DivJ ne peuvent plus atteindre le pôle flagellé, et d'autre part, les molécules de DivK-P déphosphorylées par PleC ne peuvent plus retourner au pôle pédonculé pour y être phosphorylées par DivJ. Il en résulte donc que DivK se délocalise rapidement du pôle flagellé sous l'influence de PleC. C'est précisément à ce moment que le flagelle se met en rotation. En conclusion, la délocalisation de DivK du pôle flagellé constitue bien le checkpoint qui coordonne l'initiation de la rotation du flagelle avec l'achèvement de la division bactérienne. Ce checkpoint pourrait par exemple servir à éviter que le flagelle ne commence à fonctionner avant que la cellule flagellée ne soit détachée, et donc à éviter d'arracher la cellule prédivisionnelle du substrat auquel elle est attachée par son pédoncule.

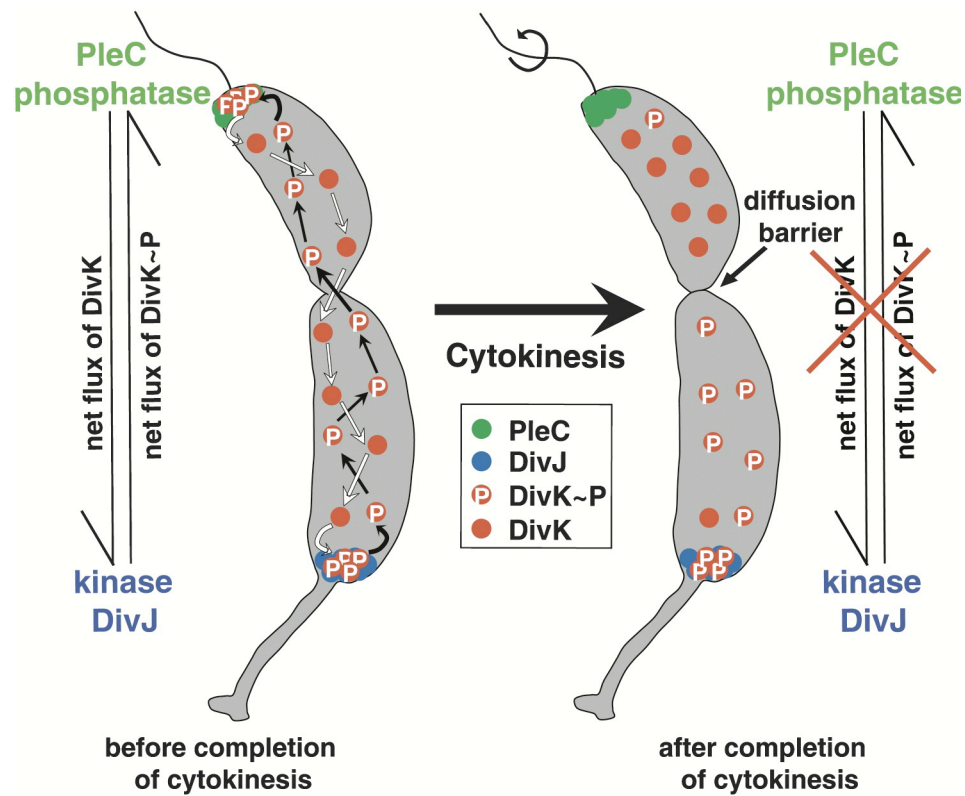


Figure 25: Modèle de ping-pong schématisant le phosphorelais DivJ-DivK-PleC. Image issue de (Matroule et al., 2004).

4. « Morphological and functional asymmetry in α -Proteobacteria »

Cette dernière partie de l'introduction sera illustrée par un article publié dans la revue « TRENDS in Microbiology ».

Présentation du travail

Ce manuscrit illustre deux idées majeures. La première suggère que le régulon de CtrA est conservé au sein des α -protéobactéries, même s'il existe des différences, par exemple des cibles différentes de CtrA mais toutes impliquées dans le même processus cellulaire, ou des cibles spécifiques pour chaque espèce. La seconde idée supporte l'hypothèse que les α -protéobactéries se divisent de manière asymétrique, dès lors qu'au moins 4 espèces d' α -protéobactéries présentent une division asymétrique.

Contribution des auteurs

L'identification des cibles du régulon de CtrA chez les différentes espèces d' α -protéobactéries ainsi que les données présentées aux figures 2 et 3 ont été obtenues par R.H. et A-F.B. Les micrographies électroniques à balayage ont été prises et mises en forme par RH. La rédaction de l'article a été réalisée par R.H. et X.D.B. L'initialisation et le suivi du travail ont été réalisés par J-J.L. et X.D.B.

Morphological and functional asymmetry in α -proteobacteria[☆]

Régis Hallez, Anne-Flore Bellefontaine, Jean-Jacques Letesson and Xavier De Bolle

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM), University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

The release of an increasing number of complete bacterial genomic sequences allows the evolutionary analysis of processes such as regulatory networks. CtrA is a response regulator of the OmpR subfamily, belonging to a complex regulatory network in the dimorphic bacterium *Caulobacter crescentus*. It coordinates the cell cycle with an asymmetric division, which is part of the adaptation of *Caulobacter* to poor-nutrient environments. CtrA is only found in α -proteobacteria, a group of bacteria encompassing genera with very distinct lifestyles, including host-associated bacteria. Analyses of CtrA regulatory networks and morphological examinations of some α -proteobacteria are presented. Our observations suggest that the core of the CtrA regulation network is conserved and that α -proteobacteria divide asymmetrically. We propose that the two daughter cells might be differentiated bacteria, each one displaying specific functions.

It is generally accepted that in eukaryotic cells, the cell shape allows specific functions to be performed. For example, a neuron displays a characteristic shape that is very different from an intestinal epithelial cell, and both cell types use these morphological features to perform different functions. In bacteria, there are also different cell shapes that have related functions but molecular mechanisms that are used to achieve such morphological specialization are poorly documented. The bacterial differentiation is a clear example of such a phenomenon, allowing *Myxococcus xanthus* [1] or *Bacillus subtilis* [2] to perform a complex development. *Caulobacter crescentus* is one bacterial model system that has been used to address this question because this bacterium divides asymmetrically to produce two morphologically and functionally different progeny cells. In this bacterium, the response regulator CtrA, which belongs to a complex regulatory network, acts as a molecular switch that allows the coordination of cell cycle progression and morphogenesis by controlling the expression level of ~ 100 genes [3–6]. Moreover, the dynamic positioning of signal transduction proteins allows temporal and spatial control of the activity (by phosphorylation) and presence (by proteolysis) of CtrA [7–11] and consequently determines the fate of each cell type. This network allows a mother *Caulobacter* cell to

produce two genetically identical but morphologically and functionally different progeny cells, one being a smaller flagellated cell that is unable to replicate and the other a stalked cell that is competent for replication. Dimorphism results in an organism that is perfectly adapted to nutrient-poor environments because the flagellated form searches for nutrients and, when it finds them, differentiates into the stalked form that is responsible for the colonization of the niche by active replication. Thus, the CtrA regulatory network participates in the expression of an asymmetric genetic program leading to the dimorphism of *C. crescentus* and its adaptation to constant famine.

In addition to the free-living bacterium *C. crescentus*, the CtrA response regulator has been identified in other α -proteobacteria [12–14], for example, the plant symbionts *Mesorhizobium loti* and *Sinorhizobium meliloti*, the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*, and the facultative and obligate mammalian pathogens *Brucella* spp. and *Rickettsia prowazekii*, respectively. The biological role of CtrA is therefore intriguing because most α -proteobacteria are not known to display a complex dimorphism, as occurs in *C. crescentus*, and, moreover, they present lifestyles radically different from each other. Here, we propose some common features between six α -proteobacterial species (representative of six α -proteobacterial genera) and discuss a potential conserved biological role of the CtrA network in the expression of an asymmetric genetic program. To characterize the CtrA regulon (i.e. genes directly regulated by CtrA) and the signal transduction system that controls CtrA, using genomic analysis. Electron microscopy observation of four α -proteobacterial species revealed asymmetric divisions very similar to those reported for *C. crescentus* and *S. meliloti* [11].

Partially conserved CtrA-dependent regulon

The DNA-binding domain of CtrA recognizes and binds to a well described consensus sequence in *C. crescentus*. This consensus sequence (9-mer TTAA-N₇-TTAAC) was found in many cell cycle-regulated promoters before the discovery of the *ctrA* gene itself [3,15]. DNA microarray and chromatin immunoprecipitation experiments allowed the description of the CtrA regulon in *C. crescentus* as well as the identification of a second CtrA-binding site consensus, the 8-mer TTAACCAT [4,16].

Here, we predict the CtrA regulon for α -proteobacteria, by searching the available genomic data for all promoter regions containing CtrA-binding sites, 9-mer and/or 8-mer.

[☆] Supplementary data associated with this article can be found at doi:10.1016/j.tim.2004.06.002

Corresponding author: Xavier De Bolle (xavier.debolle@fundp.ac.be).

Available online 2 July 2004

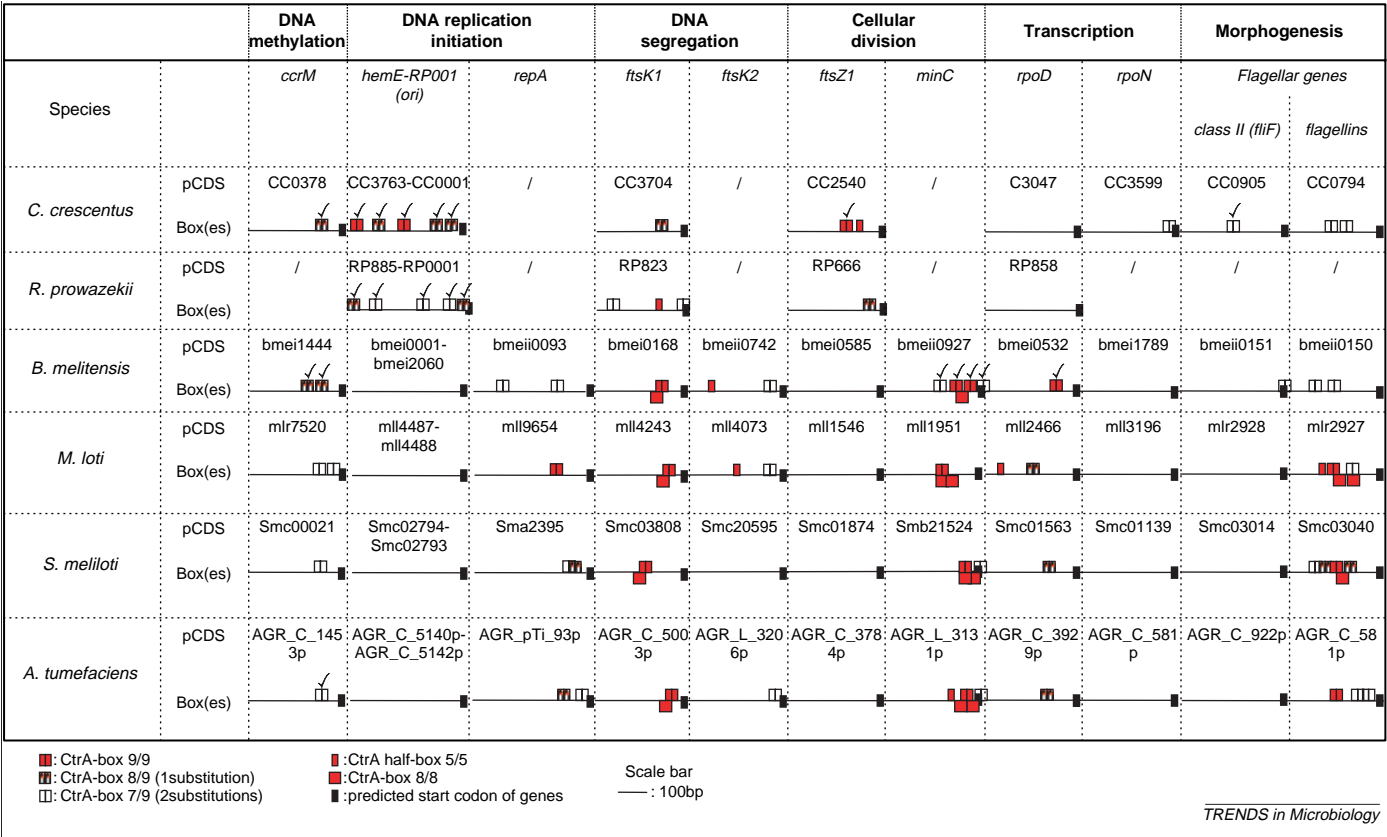


Figure 1. CtrA-binding sites (CtrA boxes) found in promoters (upstream regions of coding sequences, because +1 sites are not predicted) potentially regulated by CtrA in at least one of the six species of α -proteobacteria. The cellular process-related genes are: *ccrM* for DNA methylation, *hemE-RP001* and *repA* for DNA replication initiation, *ftsK1* and *ftsK2* for DNA segregation, *ftsZ1* and *minC* for cellular division, *rpoD* and *rpoN* for transcription and class II flagellar genes and flagellins for morphogenesis. The six species of α -proteobacteria include *Caulobacter crescentus*, *Rickettsia prowazekii*, *Brucella melitensis*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens*. We have scanned genomes with these consensus sequences using 'genome-scale DNA-pattern' available from the Regulatory Sequence Analysis Tools web-site (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) [33]. The three consensus sequences of the CtrA boxes are TTAA-N₇-TTAAC (9/9), TTAAC (5/5) and TTAACCAT (8/8), respectively. The symbol '?' means that no strong homolog was found in the corresponding species. The tick (?) refers to experimental data published in the literature showing that these CtrA boxes are effectively bound by CtrA *in vitro*. The reference number of each predicted coding sequence (pCDS) in each species as available in the corresponding GenBank files are indicated in the 'pCDS' lines. GenBank accession numbers are: NC_002696 for *C. crescentus* [34]; NC_000963 for *R. prowazekii* [35]; NC_003317 and NC_003318 for *B. melitensis* [36]; NC_002678, NC_002679 and NC_002682 for *M. loti* [37]; NC_003047, NC_003037 and NC_003078 for *S. meliloti* [38]; NC_003062, NC_003063, NC_003064 and NC_003065 for *A. tumefaciens* [39].

Experimental data on some CtrA target genes demonstrated that these two consensus sequences are bound by CtrA in at least four α -proteobacterial species [12–14,16]. Figure 1 shows schematically the CtrA boxes found in the promoter of genes involved in several cellular and developmental processes, namely DNA methylation, DNA replication initiation, DNA segregation, cellular division, transcription and morphogenesis. The fact that several predictions of CtrA target genes were confirmed by *in vitro* footprinting (marked by a tick in Figure 1) strengthens the method of prediction [13,14,17–22].

Our observations suggest, on the one hand, that similar processes are regulated by CtrA through the control of either orthologous target genes (e.g. *ccrM* for DNA methylation) or distinct target genes. For example, CtrA controls the initiation of cell division by regulating transcription of the *ftsZ* gene encoding the tubulin-like cell division protein in *C. crescentus* [17,23] (and probably in *R. prowazekii*) and presumably by controlling the expression level of the *minC* gene encoding an inhibitor of Z-ring formation in the four other species. By contrast, some potential CtrA target genes appear to be more specific, as illustrated by the *tolQ* gene, the expression of

which might be under CtrA control only in the four species associated with eukaryotic cells (See Table 1 in supplementary material online). In *Escherichia coli*, TolQ, TolR and TolA proteins form a complex which is probably involved in an energy dependent process necessary for the translocation of some outer membrane components [24]. Data presented in Figure 1 and supplementary Table 1 strongly suggest that, during evolution: (i) the control of several cellular and developmental processes by CtrA has been conserved through either the same or different target genes and (ii) some molecular mechanisms have been placed under CtrA control only in some species. Thus, the CtrA regulon appears to be conserved, at least partially, between the six studied α -proteobacterial species.

Conserved CtrA control system

In *C. crescentus*, at least two mechanisms are involved in the temporal and spatial control of CtrA (Figure 2). The first mechanism controls phosphorylation of CtrA through a phosphorelay involving the CckA hybrid histidine kinase (HK) [7] and a probable unidentified histidine phosphotransferase. The second mechanism controls proteolysis, and probably also the phosphorylation state of CtrA, which

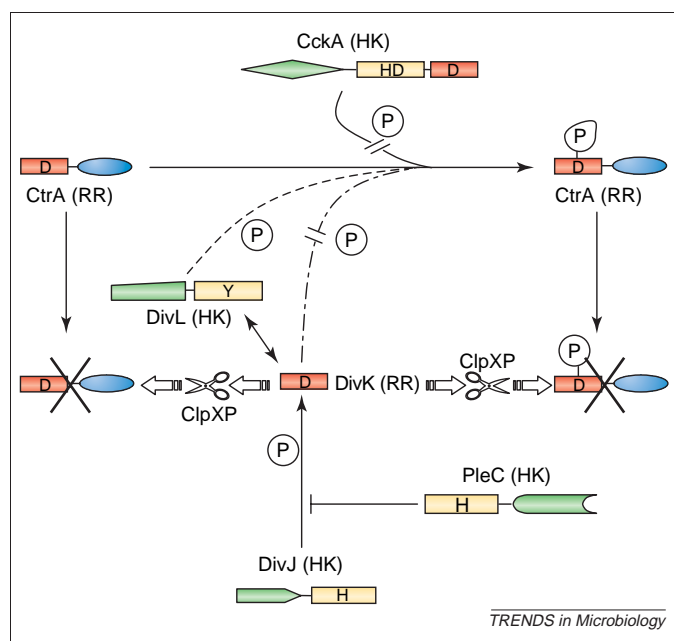


Figure 2. Schematic representation of the CtrA control system proposed in *Caulobacter crescentus*. The sensor and transmitter domains of histidine kinases (HK) are indicated in green and yellow, respectively. The receiver domain of response regulators (RR) is in red. H, Y and D represent phosphorylated residues, histidine and tyrosine for HK and aspartate for RR, respectively. The DNA-binding domain of CtrA is illustrated in blue. Arrows denote the flow of phosphoryl groups, but do not indicate that the HK and CtrA directly interact. Given that CckA and DivK possess a receiver domain with a conserved transphosphorylated aspartate (D), it is probable that the phosphotransfer between one of these factors and CtrA is indirect, probably involving an unidentified histidine phosphotransferase. Dashed lines illustrate a phosphate transfer between DivL and CtrA, only demonstrated *in vitro* [27]. The double arrow connecting DivL and DivK illustrates a physical interaction shown by a yeast two-hybrid screen [28]. DivK is able to stimulate the proteolytic degradation of CtrA-P and CtrA [10,25] and probably also to control the phosphorylation state of CtrA, as illustrated by the dashed line between DivK and CtrA-P [6]. Antagonistic activities of DivJ and PleC on the DivK phosphorylation state are illustrated. The pair of scissors symbolizes the proteolytic machinery ClpX/ClpP, responsible for the degradation of CtrA.

is mediated by the monodomain response regulator (RR) DivK [10,25] whose phosphorylation level and localization are controlled by at least two homologous HKs, DivJ and PleC [8,9,11,26]. Although DivJ and PleC are able to phosphorylate DivK, it appears that these two histidine kinases have antagonistic activities on the cellular concentration of phosphorylated DivK *in vivo* [8,11]; this suggests that DivJ effectively phosphorylates DivK, and PleC probably dephosphorylates it. Another protein, known as DivL, homologous to classical HKs but with a tyrosine in place of the conserved histidine, is able to phosphorylate CtrA *in vitro* but not DivK [27]. However, DivL was isolated in a yeast two-hybrid screen using DivK as the bait, strongly suggesting that these two proteins can physically interact [28]. One of the most surprising features of these regulating factors is their subcellular localization, which changes during the cell cycle [7–9,11,29]; the subcellular localization of DivL, however, is still unknown.

We have identified orthologs of these proteins in five other α -proteobacterial species. Orthologs of each of the five signaling proteins (DivK, DivJ, PleC, DivL and CckA) were found in all genomes analyzed (Figure 3), except for *R. prowazekii*, which only possesses homologs of the *pleC* and *ctrA* genes (respectively called *barA* and *czcR*, [14]).

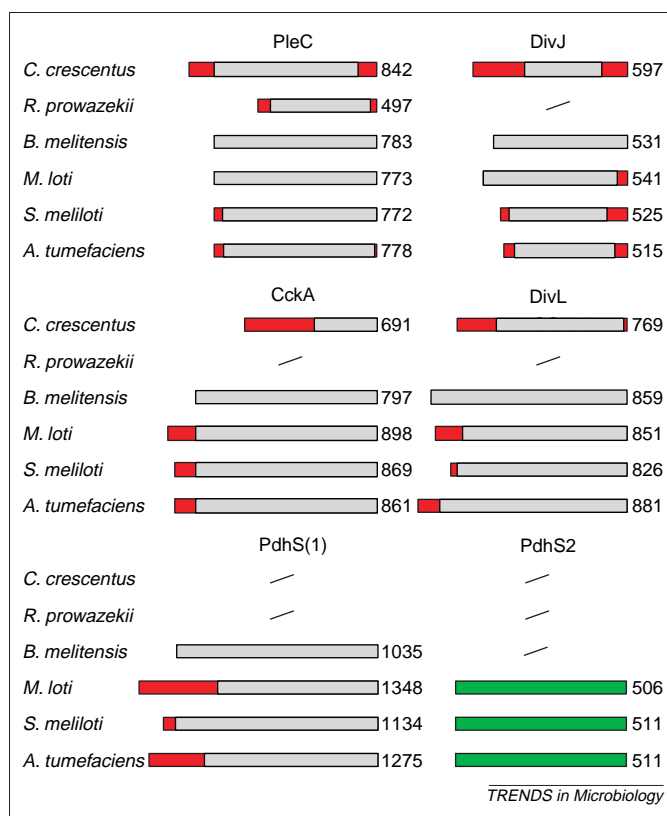


Figure 3. Schematic representation of orthologs of the sensors involved in the control of CtrA found in six α -proteobacterial genomes: *Caulobacter crescentus*, *Rickettsia prowazekii*, *Brucella melitensis*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens*. The portion of the proteins with similarity to the *B. melitensis* homolog (considered here as a reference) is indicated in grey, illustrating that it is often the C-terminal portion of the protein that is conserved. The portion of PdhS2 orthologs with high similarity is represented in green. The length (in amino acids) of each protein in each species is indicated on the right. The '/' symbol indicates that no strong homolog was found in the corresponding species. The reference number of each gene encoding these proteins is indicated in Table 2 of the supplementary material online. CtrA and DivK are not shown because they are very well conserved over their whole length, except for the C-terminal peptide of CtrA [40].

Interestingly, as illustrated in Figure 2, PleC is an upstream factor in a cascade controlling CtrA activity. As is the case for most obligate pathogens, *R. prowazekii* has a much reduced genome size (1.1 Mb compared with more than 3 Mb for the other species). Surprisingly, it appears that *R. prowazekii* did lose the intermediate factors (DivJ and DivK) during evolution, maintaining only the upstream and the downstream components of this pathway. Therefore, in this organism, CtrA activity is either controlled by an unidentified signaling pathway, or it is directly controlled by PleC, in contrast to what is reported for *C. crescentus*, and probably occurring in the four other species. Another interesting observation is that the interacting domains (i.e. transmitter domains of HK [28]) of the partners are much more conserved than their putative sensor domains (Figure 3), suggesting that a similar integration process might be controlled by different signals from one bacterium to the other.

We have also identified new putative members of the CtrA control pathway in the genomes of *Brucella melitensis*, *M. loti*, *S. meliloti* and *A. tumefaciens*. These genes are called *pdhS* for 'pleC/divJ homolog sensor' because they present a high similarity with both so-called

genes involved in CtrA control in *C. crescentus*. The fact that these new two-component signal transduction proteins were identified in facultative host-associated bacteria might reflect their ability to sense and adequately respond to diversified signals, in particular those encountered during their host-associated stages.

To summarize, on the one hand, the main differences between orthologs of proteins controlling CtrA activity in each of the six analyzed α -proteobacterial species are found in the N-terminal extremity of HK, where sensor domains are usually located. By contrast, the four host-associated species present new potential CtrA-controlling factors. Taking both of these observations together, and knowing that α -proteobacterial species display very different lifestyles, it is conceivable that this bacterial group might have kept a common regulatory network to adapt to very different ecological niches during evolution.

Asymmetric division of α -proteobacteria

Few bacterial species are known to divide asymmetrically. Nevertheless, a dividing *Caulobacter* mother cell produces two daughter cells that differ in size and morphology: a larger stalked cell and a smaller flagellated cell. Recently, Lam *et al.* [11] have reported that *S. meliloti* is also able to divide asymmetrically and therefore produces two progeny cells of different size [11]. As illustrated in Figure 4, scanning electron micrographs taken on the α -proteobacterial species *C. crescentus*, *Brucella abortus*, *S. meliloti* and *A. tumefaciens* strongly suggest that asymmetric division is a common feature in the α -proteobacterial group. Indeed, bacteria at the end of septation are about to produce two daughter cells of different size. This particular phenomenon is probably the result of a common molecular mechanism ensuring the correct location of the division machinery. Interestingly, *C. crescentus* does not have orthologs of *minC*, *minD* and *minE* genes, in contrast to *Brucella*, *S. meliloti* and *A. tumefaciens*. In *E. coli*, these genes are involved in the correct equatorial localization of the septum, by inhibiting the formation of septal rings at

polar sites [23,30]. Thus, the presence of Min proteins in α -proteobacteria displaying an asymmetric division suggests that this system might be involved in the inhibition of septation at cell poles, but would not be required for the correct positioning of the septum next to the centre of the mother cell.

To summarize, we have underlined some common features between species of the highly diversified α -proteobacterial group. The six species mentioned above: (i) possess a homolog of the essential *ctrA* gene, experimentally shown as functional in at least four of these six species; (ii) present a conserved CtrA regulon, with some specificities that might be related to the lifestyle of these bacteria; (iii) possess orthologs of genes involved, in the case of *C. crescentus*, in the temporal and spatial control of CtrA and (iv) display a clear asymmetric division, at least for the four observed species. However, it is possible that CtrA regulons in some α -proteobacteria might have strongly diverged from those reported here, as is the case for *Rhodobacter capsulatus*. Indeed, in this species, the *ctrA* and *cckA* genes are not essential for viability [31,32] and do not appear to control essential cell cycle processes, as suggested by genomic analysis (data not shown).

There is no polar organelle, such as a stalk or a flagellum, described for *Sinorhizobium* or *Brucella*. However, recent experiments performed on *S. meliloti* demonstrated that the response regulator DivK presents an asymmetric subcellular localization similar to the one described in *C. crescentus* [11]. Thus, the polar localization of the CtrA-controlling factors could be another feature commonly used by several α -proteobacterial species, which might allow the differential regulation of genes in small versus large cells. We propose that the cellular differentiation morphologically observed in *C. crescentus* could be present at the molecular level in the other α -proteobacteria.

In conclusion, we propose that specific functions of the two cell types should be examined in several α -proteobacteria. These specific functions could, for example, be their capacity to accomplish one of the steps involved in their symbiotic or parasitic relationship with the eukaryotic host. Moreover, it is also possible that other bacteria develop forms of primitive differentiation that remain to be discovered.

Acknowledgements

We thank S.L. Long and J. Michiels for their gift of *S. meliloti* wild-type strain Rm1021 and *A. tumefaciens* wild-type strain NT1, respectively. We thank C. Jacobs-Wagner for helpful and stimulating discussions. We also thank the 'Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique' of the University of Namur. Régis Hallez is holding a fellowship from the F.R.I.A. (Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture).

References

- 1 Kaplan, H.B. (2003) Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 572–577
- 2 Margolis, P. *et al.* (1991) Differentiation and the establishment of cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 330–335
- 3 Quon, K.C. *et al.* (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84, 83–93

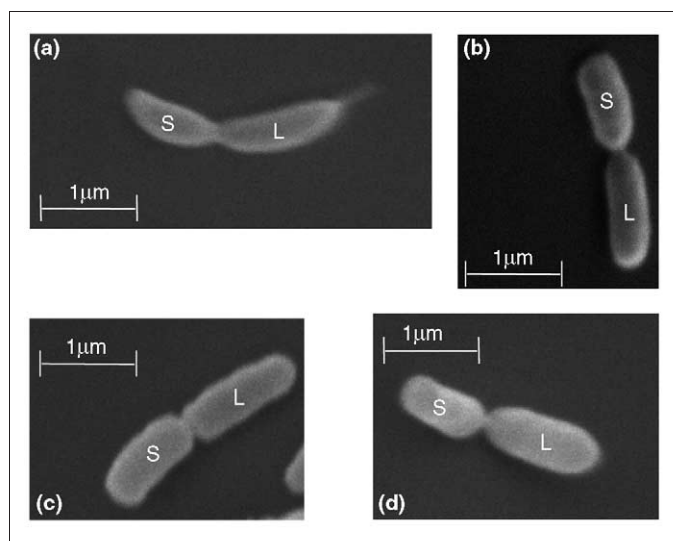


Figure 4. Scanning electron micrographs of α -proteobacterial cells just before septation. The species observed are (a) *Caulobacter crescentus*, (b) *Brucella abortus*, (c) *Sinorhizobium meliloti* and (d) *Agrobacterium tumefaciens*. The large and small cells are called L and S, respectively.

- 4 Laub, M.T. *et al.* (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* 290, 2144–2148
- 5 McAdams, H.H. and Shapiro, L. (2003) A bacterial cell-cycle regulatory network operating in time and space. *Science* 301, 1874–1877
- 6 Ausmees, N. and Jacobs-Wagner, C. (2003) Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 225–247
- 7 Jacobs, C. *et al.* (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* 97, 111–120
- 8 Wheeler, R.T. and Shapiro, L. (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol. Cell* 4, 683–694
- 9 Jacobs, C. *et al.* (2001) Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4095–4100
- 10 Hung, D.Y. and Shapiro, L. (2002) A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13160–13165
- 11 Lam, H. *et al.* (2003) The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev. Cell* 5, 149–159
- 12 Barnett, M.J. *et al.* (2001) A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183, 3204–3210
- 13 Bellefontaine, A.F. *et al.* (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol. Microbiol.* 43, 945–960
- 14 Brassinga, A.K. *et al.* (2002) Conserved response regulator CtrA and IHF binding sites in the alpha-proteobacteria *Caulobacter crescentus* and *Rickettsia prowazekii* chromosomal replication origins. *J. Bacteriol.* 184, 5789–5799
- 15 Marczyński, G.T. and Shapiro, L. (1992) Cell-cycle control of a cloned chromosomal origin of replication from *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.* 226, 959–977
- 16 Laub, M.T. *et al.* (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4632–4637
- 17 Kelly, A.J. *et al.* (1998) Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev.* 12, 880–893
- 18 Quon, K.C. *et al.* (1998) Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 120–125
- 19 Wu, J. *et al.* (1998) An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1443–1448
- 20 Reisenauer, A. *et al.* (1999) The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J. Bacteriol.* 181, 2430–2439
- 21 Robertson, G.T. *et al.* (2000) The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J. Bacteriol.* 182, 3482–3489
- 22 Kahng, L.S. and Shapiro, L. (2001) The CcrM DNA methyltransferase of *Agrobacterium tumefaciens* is essential, and its activity is cell cycle regulated. *J. Bacteriol.* 183, 3065–3075
- 23 Rothfield, L.I. *et al.* (2001) Polar explorers: membrane proteins that determine division site placement. *Cell* 106, 13–16
- 24 Lazzaroni, J.C. *et al.* (1999) The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 191–197
- 25 Domian, I.J. *et al.* (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* 90, 415–424
- 26 Hecht, G.B. *et al.* (1995) An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* 14, 3915–3924
- 27 Wu, J. *et al.* (1999) A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13068–13073
- 28 Ohta, N. and Newton, A. (2003) The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J. Bacteriol.* 185, 4424–4431
- 29 Sciochetti, S.A. *et al.* (2002) Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 184, 6037–6049
- 30 de Boer, P.A. *et al.* (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* 56, 641–649
- 31 Lang, A.S. and Beatty, J.T. (2000) Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 859–864
- 32 Lang, A.S. and Beatty, J.T. (2002) A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J. Bacteriol.* 184, 913–918
- 33 van Helden, J. *et al.* (2000) A web site for the computational analysis of yeast regulatory sequences. *Yeast* 16, 177–187
- 34 Nierman, W.C. *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4136–4141
- 35 Andersson, S.G. *et al.* (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133–140
- 36 DelVecchio, V.G. *et al.* (2002) The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 90, 587–592
- 37 Kaneko, T. *et al.* (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331–338
- 38 Galibert, F. *et al.* (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668–672
- 39 Goodner, B. *et al.* (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2323–2328
- 40 Ryan, K.R. *et al.* (2002) The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J. Mol. Biol.* 324, 443–455

Microbiological conferences scheduled for October 2004

ASM Conference on Functional Genomics & Bioinformatics Approaches to ID Research
6–9 October, Portland, Oregon, USA

Frontiers of Cellular Microbiology and Cell Biology: Spatial and Temporal Dynamics of the Endomembrane System
16–21 October, San Feliu de Guixols, Spain

11th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections
24–27 October, Charleston, South Carolina, USA

44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy
30 October–2 November, Washington, USA

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les données présentées dans l'article précédent suggèrent que *B. abortus* se divise asymétriquement d'une manière comparable à *C. crescentus*. Sachant que, d'une part, CtrA est impliqué dans l'asymétrie fonctionnelle de *C. crescentus*, et que d'autre part, le régulon de CtrA semble être particulièrement bien conservé, nous nous sommes intéressés aux protéines contrôlant CtrA chez *B. abortus* afin d'étudier leur implication dans l'asymétrie fonctionnelle de ce pathogène. Parmi celles-ci, notre attention s'est focalisée sur l'HK PdhS. Cette HK est homologue à DivJ et PleC, 2 HK qui contrôlent l'état de phosphorylation et la localisation du RR DivK, lui-même impliqué dans la régulation de l'activité de CtrA. Outre le caractère essentiel du gène *pdhS* et la capacité du produit de ce gène à interagir physiquement avec DivK, nous avons étudié sa distribution subcellulaire au moyen de fusions traductionnelles de cette protéine avec des protéines fluorescentes. L'expression de ces protéines hybrides nous a permis de suivre la localisation de PdhS au sein de bactéries vivantes en cours de croissance, chez *B. abortus* et chez d'autres α -protéobactéries. La distribution asymétrique de PdhS au sein de la cellule prédivisionnelle de *B. abortus* reflète une asymétrie moléculaire déjà observée au niveau morphologique. Enfin, l'étude de la localisation de PdhS chez *B. abortus* nous a permis, non seulement de valider que cette espèce se divise de manière asymétrique, mais également de proposer que *B. abortus* développe un programme de différenciation bactérienne insoupçonné jusqu'alors.

RESULTATS

« *The Asymmetric Distribution of the Essential Histidine Kinase PdhS Indicates a Differentiation Event in Brucella abortus* »

Les résultats de cette thèse ont fait l'objet d'une publication dans la revue « The EMBO Journal ».

Présentation du travail

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé l'HK PdhS. Les données présentées ont permis de démontrer entre autres que PdhS (i) est encodé par un gène essentiel à la survie de *B. abortus*, (ii) est localisé au vieux pôle de *B. abortus*, ainsi qu'au nouveau pôle mais uniquement après un événement qui pourrait correspondre à une différenciation bactérienne, (iii) interagit physiquement avec DivK et co-localise avec celui-ci au(x) pôle(s), (iv) est impliqué dans le contrôle de la division bactérienne, et ce probablement au travers du contrôle de l'activité de CtrA, (v) reste localisé aux pôles de *B. abortus* au cours d'une infection cellulaire, et (vi) présente la particularité d'être localisé au(x) pôle(s) d'autres α -protéobactéries. Ces données nous indiquent *B. abortus* pourrait se différencier, à l'instar de *C. crescentus*. Nous avons alors émis l'hypothèse que la division asymétrique et la différenciation bactérienne pourraient être des mécanismes conservés au cours de l'évolution au sein des α -protéobactéries.

Contribution des auteurs

Toutes les données présentées dans l'article ont exclusivement été obtenues par R.H., à l'exception des expériences suivantes : J.M. a participé à la construction des mutants *divJ* et *pleC* de *B. abortus*, à la construction des fusions traductionnelles entre les variants de GFP et PdhS ou PleC, et a localisé la fusion PdhS-CFP dans *S. meliloti*. V.V M. et M.W. ont réalisé la matrice double-hybride présentée à la Figure S4. La rédaction de l'article a été réalisée par R.H. et X.D B. L'ensemble du travail a été supervisé par X.D B, C.J-W., J-J.L. et J.V.

The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*

Régis Hallez^{1,3}, Johann Mignolet¹,
Vincent Van Mullem¹, Maxime Wery¹,
Jean Vandenhaute¹, Jean-Jacques
Letesson¹, Christine Jacobs-Wagner²
and Xavier De Bolle^{1,*}

¹Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM), University of Namur (FUNDP), Namur, Belgium and ²Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, Yale University, New Haven, CT, USA

Many organisms use polar localization of signalling proteins to control developmental events in response to completion of asymmetric cell division. Asymmetric division was recently reported for *Brucella abortus*, a class III facultative intracellular pathogen generating two sibling cells of slightly different size. Here we characterize PdhS, a cytoplasmic histidine kinase essential for *B. abortus* viability and homologous to the asymmetrically distributed PleC and DivJ histidine kinases from *Caulobacter crescentus*. PdhS is localized at the old pole of the large cell, and after division and growth, the small cell acquires PdhS at its old pole. PdhS may therefore be considered as a differentiation marker as it labels the old pole of the large cell. Moreover, PdhS colocalizes with its paired response regulator DivK. Finally, PdhS is able to localize at one pole in other α -proteobacteria, suggesting that a polar structure associating PdhS with one pole is conserved in these bacteria. We propose that a differentiation event takes place after the completion of cytokinesis in asymmetrically dividing α -proteobacteria. Altogether, these data suggest that prokaryotic differentiation may be much more widespread than expected.

The EMBO Journal (2007) 26, 1444–1455. doi:10.1038/sj.emboj.7601577; Published online 15 February 2007

Subject Categories: differentiation & death; microbiology & pathogens

Keywords: asymmetry; *Brucella*; *Caulobacter*; differentiation; polar localization

Introduction

Asymmetry and cellular differentiation are intrinsic features important for cell diversity in both eukaryotic and prokaryotic

organisms. *Bacillus subtilis* and *Caulobacter crescentus* are two well-documented bacterial models of differentiation. Indeed, sporulation of *B. subtilis* is initiated by an asymmetric division immediately followed by maturation of the spore (Errington, 2003). *C. crescentus* is an α -proteobacterium displaying reproductive dimorphism, which is maintained by invariable asymmetric division at each cell cycle, giving rise to two genetically identical but morphologically different daughter cells, a sessile stalked cell and a motile swarmer cell (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). The swarmer cell must differentiate into a stalked cell before initiating a new round of DNA replication. The specific developmental program associated with the differentiation of the swarmer progeny (Swarmer progeny-specific program, i.e. SwaPS program) is directly linked to the completion of the previous cell cycle and cytokinesis (Huguenel and Newton, 1982). The fact that the SwaPS program is initiated only after the completion of cytokinesis ensures the generation of different cell types by asymmetric cell division. A complex regulatory network composed of several two-component signal transduction systems, involving histidine kinases (HK) and response regulators (RR), is implicated in the control of differentiation in *C. crescentus* (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003). At the core of this regulatory network, PleC and DivJ, two asymmetrically distributed HK (Jacobs-Wagner, 2004), couple SwaPS development with cell division, through the spatial regulation of a conserved single-domain RR named DivK. Indeed, DivJ is localized at the stalked pole and PleC at the flagellated pole of the predivisional cell (Wheeler and Shapiro, 1999). During the cell cycle, DivK is first localized at the stalked pole, where it interacts with and is phosphorylated by DivJ. This phosphorylation allows DivK to localize at the opposite pole, that is, the flagellated pole (Lam *et al.*, 2003). When cytokinesis is completed, the release of DivK from the flagellated pole through the phosphatase activity of PleC induces the initiation of the SwaPS program (Matroule *et al.*, 2004). Accordingly, DivK is completely delocalized in a $\Delta divJ$ strain by remaining dispersed in the cytoplasm of all cell types, whereas in $\Delta pleC$ cells, DivK is found at both poles because of its inability to be released from the flagellated pole. Thus, dynamic localization of DivK, controlled by the opposite activity and position of DivJ and PleC, provides a simple molecular mechanism to coordinate cytokinesis with the developmental program in *C. crescentus* (Matroule *et al.*, 2004). Little is known about the mechanisms by which DivK activates or represses the SwaPS program, but it was reported that DivK controls the activity of CtrA, a major transcriptional regulator controlling both cell cycle and morphogenesis (Quon *et al.*, 1996; Laub *et al.*, 2000; Hung and Shapiro, 2002).

Interestingly, other α -proteobacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* and *B. abortus* also display an asymmetric division (Hallez *et al.*, 2004) despite the fact that they have very different lifestyles, but we do not know if all

*Corresponding author. Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM), University of Namur (FUNDP), 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium. Tel.: +32 81 72 44 38; Fax: +32 81 72 42 97; E-mail: xavier.debolle@fundp.ac.be

³Present address: Laboratoire de Génétique des Procaryotes (LGP), Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires (IBMM), Université Libre de Bruxelles (ULB), 12 Rue des Professeurs Jeener et Brachet, 6041 Gosselies, Belgium

Received: 6 November 2006; accepted: 8 January 2007; published online: 15 February 2007

these bacterial species display a differentiation program. Moreover, components of the DivK regulatory network are well conserved among these α -proteobacteria, suggesting that species other than *C. crescentus* may go through a developmental program (Hallez et al, 2004). *B. abortus*, a class III pathogen, is a facultative intracellular bacterium causing brucellosis in domestic mammals like cows and Malta fever in humans (Boschioli et al, 2001). In *B. abortus*, the role of CtrA is partially conserved compared with *C. crescentus*, which indicates plasticity of this regulatory network along evolution (Bellefontaine et al, 2002). An additional HK homologous to PleC and DivJ, called PdhS (PleC-DivJ homolog sensor), was also identified. PdhS is a predicted large HK without transmembrane segments, conserved in several α -proteobacteria (Hallez et al, 2004).

Here, we show in *B. abortus* that PdhS is cytoplasmic and belongs to the DivK regulatory network. PdhS is located at the old pole of the large *B. abortus* cell and, after division, the small cell matures to acquire PdhS at its old pole, whereas PdhS remains at the old pole of the large cell. As the *pdhS* gene is essential for viability in *B. abortus*, this maturation of a small cell into a large one is proposed to be obligatory. The cell-cycle pattern of PdhS suggests that the small cell matures into the large one in a manner reminiscent of the swarmer-to-stalked cell differentiation in *Caulobacter*. PdhS being also able to localize at one pole of *C. crescentus* and *S. meliloti*, we suggest not only that a functional asymmetry occurs at a molecular level in at least three different α -proteobacterial species, but also that a differentiation event could take place after the completion of asymmetric division.

Results

The functional DivK homolog displays a phosphorylation-dependent polar localization in *B. abortus*

We first characterized the *B. abortus* DivK homolog (AAF14690). The *divK* gene is predicted to encode a 123-amino-acid protein with a molecular mass of 14 kDa that shares 79% identity with DivK from *C. crescentus* (*cc*DivK) (Table I). If *B. abortus* DivK is able to play a role similar to *cc*DivK, it is expected to complement a *divK* mutation in *C. crescentus*. As *cc*DivK is an essential gene, by transducing a $\Delta divK::Spec^R$ lysate we demonstrated that *B. abortus divK* expressed from the medium-copy plasmid pRH223 was able to support viability in *C. crescentus* as the only copy of *divK* in the cells (data not shown). Immunoblot analysis of this strain confirmed that the only copy of *divK* expressed in this strain was *B. abortus divK* (data not shown). All attempts to delete *divK* in *B. abortus* failed, suggesting that this gene is also essential in *B. abortus*. Moreover, as indicated below, DivK is able to interact with its predicted kinases in a yeast

two-hybrid (Y2H) test. These results argue that *B. abortus* DivK is the functional homolog of *cc*DivK.

Then we postulated that the subcellular distribution of DivK could be polar, at least in a fraction of *B. abortus* cells, as it is the case in *C. crescentus* and *S. meliloti*. To test this possibility, we first localized DivK-YFP with a *divK-yfp* fusion expressed from the pRH336 in the *B. abortus* 544 wild-type (WT) strain and found that DivK-YFP was localized at one pole of the cells in approximately one half of the population (Figure 1). Similar results were obtained with the strain XDB1106, in which a *divK-yfp* fusion was integrated at the *divK* locus (see Supplementary Figure S9). When the conserved phosphorylatable Asp53 of DivK was substituted with an alanine, the DivK_{D53A}-YFP fusion expressed from pRH409 was never found polarly localized (Supplementary Figure S1), suggesting that the polar localization of DivK is dependent upon its phosphorylation state, as it was already demonstrated in *C. crescentus* and *S. meliloti* (Lam et al, 2003).

B. abortus DivK is able to directly interact with histidine kinases similar to PleC and DivJ

To identify paired histidine kinases of DivK in *B. abortus*, we performed a Y2H matrix in which the interactions of all HK

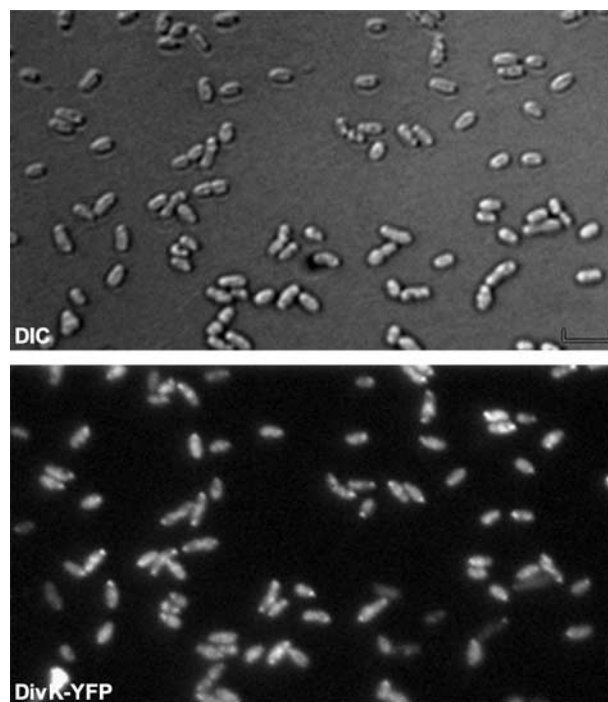


Figure 1 DivK is polarly localized in *B. abortus*. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* WT cells producing DivK-YFP from the low-copy plasmid pRH336.

Table I Identification of *B. abortus* DivK, PleC and DivJ orthologs

	BaDivK (123) ^a	BaPleC (783) ^a	BaDivJ (609) ^a	PdhS (1035) ^a
CcDivK (125) ^a	79% ^b (123/123) ^c	—	—	—
CcPleC (842) ^a	—	37% ^b (229/604) ^c	38% ^b (100/257) ^c	36% ^b (142/391) ^c
CcDivJ (597) ^a	—	45% ^b (112/245) ^c	45% ^b (112/246) ^c	39% ^b (104/261) ^c

^aNumbers in parentheses represent the length of the corresponding protein-coding ORF.

^bRepresents the percentage identity.

^cNumbers in parentheses represent the portion of the protein aligned.

and RR predicted from the *Brucella* genomic sequences (DeVecchio *et al*, 2002; Paulsen *et al*, 2002; Halling *et al*, 2005) (20 HK including two hybrid HK, CckA and PrlS, and 21 RR) were assayed (Supplementary Figures S2 and S3). We used the available entry clones (Dricot *et al*, 2004) for the RR and HK predicted to be cytoplasmic. For HK containing predicted transmembrane segments, truncated coding sequences (CDS) were amplified by PCR in order to construct new entry clones carrying CDS for C-terminal domains only, that is, the protein parts containing the HK domains (Supplementary Figure S2). The CDS from entry clones were inserted into destination vectors by recombinational cloning, in fusion with either activating domain (AD) or DNA binding domain (BD) of GAL4, as detailed in the Materials and methods section. Positive interactions were detected using the *lacZ* and *HIS3* reporter genes.

As a positive control, we found six positive interactions in the Y2H test among the 10 pairs of HK and RR predicted to be organized in operons in the genome (TcbRS, TccRS, TcdRS, TceRS, TcfRS, NtrBC, NtrYX, FeuPQ, BvrRS and NodVW) (Supplementary Figure S4). No interaction between these pairs (HK with RR, HK with HK or RR with RR) was found, arguing in favor of the specificity of these Y2H interactions. We detected physical interactions between the single-domain RR DivK and the four HK DivL, PleC, DivJ and PdhS (see below) (Figure 2A). These were the only interactions made by these four HK in the Y2H tests (Supplementary Figures S2–S4), which again suggests that positive interactions are specific. We also observed that the C-terminal part of PdhS (aa 611–1035) was sufficient for interaction with DivK, and that this is the only interaction we detected with PdhS_{611–1035} in fusion with either AD or BD of Gal4. Moreover, PdhS is able to interact with itself in the Y2H experiments (Figure 2B). This later interaction is probably, at least partially, made by the N-terminal part of the protein, as the first 613 aa alone are able to interact with the complete PdhS protein (Figure 2B). This suggests that PdhS contains at least two functional parts: an N-terminal multimerization part and a C-terminal histidine kinase part interacting with DivK.

Among the four histidine kinases interacting with DivK, three are highly similar to *C. crescentus* PleC and DivJ, the kinases of DivK (Table I). These CDS are conserved with >99% identity at the amino-acid level between *B. abortus* 9–941, *B. melitensis* 16M and *B. suis* 1330. The interaction between DivK and DivL was also demonstrated in *C. crescentus* (Ohta and Newton, 2003), but the *in vivo* implications of this interaction are not understood as it was reported that DivL could control the phosphorylation state of CtrA but not DivK (Wu *et al*, 1999). *C. crescentus* PleC and DivJ share 46% identity, and therefore belong to the same subfamily of HK. *B. abortus* PleC (YP_414082) is aligned with *cc*PleC on an extended length (Supplementary Figure S5) and presents a similar predicted topology, that is, an N-terminal periplasmic domain flanked by transmembrane segments (Supplementary Figure S6). In *C. crescentus*, the deletion of *pleC* leads to lack of motility and complete resistance to ϕ CbK and CR30 phages (Ohta *et al*, 1992; Wang *et al*, 1993; Wheeler and Shapiro, 1999), both phenotypes directly associated with a misregulation of the SwaPS program (Matroule *et al*, 2004). Expression of *B. abortus pleC* on the low-copy plasmid pRH246 in a *C. crescentus* Δ *pleC* strain restored motility and phage sensitivity to the WT level (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that PleC is the functional homolog of *cc*PleC in *B. abortus*. The proposed *B. abortus* DivJ homolog (AAX73976) is slightly more identical to the *cc*DivJ sequence compared with *cc*PleC (Table I) and this deduced protein has a similar size and predicted topology compared with *cc*DivJ, that is, several N-terminal transmembrane segments without extensive regions in the periplasm (Supplementary Figure S6). Finally, the third HK (AAX74918) is called PdhS for *P*leC-*D*ivJ *h*omolog *s*ensor, because it presents a similar degree of conservation with *cc*PleC and *cc*DivJ. The domain's composition of *B. abortus* PleC, DivJ and PdhS is represented in Supplementary Figure S6. The most striking feature is that PdhS presents a large N-terminal portion of more than 700 aa without predicted functions. Moreover, the absence of predicted transmembrane domains suggests that PdhS is a cytoplasmic histidine kinase, which is

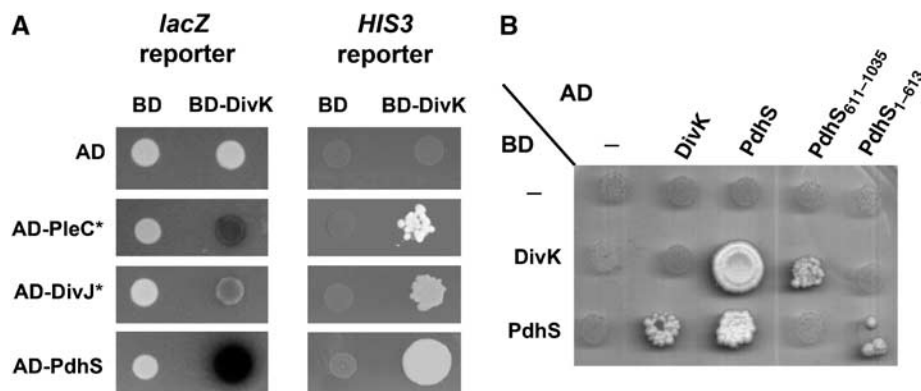


Figure 2 *B. abortus* PleC, DivJ and PdhS interact with DivK through their C-terminal domain. (A) Yeast two-hybrid assay showing physical interactions between the *B. abortus* response regulator DivK and the histidine kinases PleC, DivJ and PdhS. Activation of *lacZ* reporter gene was demonstrated as formation of blue colonies on plates containing X-Gal. Activation of *HIS3* reporter gene was measured as growth on plates without histidine but with 3-AT. “*” Represents truncated forms of PleC and DivJ fused to AD, which comprised the HATPase_C domain and excluded the predicted transmembrane domains. (B) Yeast two-hybrid assay demonstrating that the N-terminal domain of PdhS is required for its dimerization, and its C-terminal domain, comprising the HATPase_C and PAS domains, is involved in the interaction with DivK. As in (A), activation of *HIS3* reporter gene was measured as growth on plates without histidine but with 3-AT. AD and BD represent the activation and binding domains of Gal4, respectively. At least three independent experiments were performed for each yeast two-hybrid assay.

not the case with *B. abortus* or *C. crescentus* PleC and DivJ proteins. An immunoblot with anti-PdhS antibodies performed on fractionated *B. abortus* WT cells demonstrated that PdhS could be detected in the cytoplasmic soluble fraction. CtrA, a predicted cytoplasmic protein, was also detected in the same fraction, whereas VirB10, a protein predicted to be anchored to the inner membrane of *B. abortus*, was not detected in this soluble fraction (Supplementary Figure S7). These results indicate that PdhS is a large cytoplasmic histidine kinase produced by *B. abortus* at least during culture in bacteriological medium.

Altogether, these results strongly suggest that PdhS, PleC and DivJ interact with DivK and thus form a regulatory network comparable to the DivK regulatory network reported in *C. crescentus*, except for the presence of an additional identified HK, PdhS.

Neither *PleC* nor *DivJ* controls the localization of *DivK* in *B. abortus*

The *pleC* and *divJ* genes are both non-essential in *C. crescentus*, and deletion of these genes gave very different phenotypes. Whereas a *divJ*-null mutant displays a cell division defect with a weak filamentation, the deletion of *pleC* generates a characteristic differentiation default (Ohta *et al*, 1992; Wang *et al*, 1993; Wheeler and Shapiro, 1999). To investigate the biological role of *pleC*, *divJ* and *pdhS* in *B. abortus*, we tried to delete these genes. Deleting *pleC* and *divJ* was possible, but we were not able to delete *pdhS* without a plasmid-borne copy of *pdhS*, suggesting that this gene is essential (see below). As illustrated by differential interference contrast (DIC) microscopy, the $\Delta divJ$ strain (XDB1102) generated Y-shaped bacteria, a phenotype associated with a cell division defect in several α_2 -proteobacteria such as *S. meliloti* and *A. tumefaciens* (Latch and Margolin, 1997) (Figure 3A). The $\Delta pleC$ strain (XDB1101) did not display any obvious and reproducible morphological defect (data not shown). These results suggest that *divJ* could play a role in cell-cycle control in *B. abortus*, as it was reported for *C. crescentus*.

As polar localization of DivK in *B. abortus* seems to be dependent on its phosphorylation state, we checked if the absence of *divJ* or *pleC* gene could mislocalize a DivK-YFP fusion. Surprisingly, the polar DivK-YFP distribution was not modified in *B. abortus* $\Delta pleC$ or $\Delta divJ$ strains when compared with the WT control (data not shown), suggesting that PleC or DivJ could not control phosphorylation of DivK *in vivo*, in the conditions tested here. PdhS could therefore constitute a good candidate for such functions.

***PdhS* is essential for viability in *B. abortus* and its overexpression leads to a cell division defect**

To test the hypothesis of *pdhS* essentiality, we first deleted *pdhS* in the presence of a rescue copy expressed from pRH232. After checking for the deletion of the *pdhS* genomic copy by PCR, we tried to swap the rescue copy by introducing another vector from the same incompatibility group expressing *pdhS* (pRH404) or not (pBBR1-MCS4). As shown in Table II, pRH232 was replaced in the $\Delta pdhS$ strain only in the presence of another WT copy of *pdhS* (pRH404). In contrast, pRH232 could be easily cured from the *B. abortus* 544 WT strain in the presence of either the empty plasmid pBBR1-MCS4 or pRH404. The requirement for a plasmid-

borne copy of *pdhS* in a $\Delta pdhS$ strain demonstrates that *pdhS* is essential for viability in *B. abortus*.

To test whether a fragment of PdhS is sufficient to carry out the essential functions of PdhS, two parts of the CDS were inserted in pRH003, coding for either the first 613 amino acids (pRH405) or the last 424 amino acids (pRH406). These constructs were used in our plasmid swap experiment. The $\Delta pdhS$ strain was unable to replace the plasmid pRH232 by either pRH405 or pRH406 (Table II). On the other hand, pRH232 could be easily cured from WT strain in the presence of either of these plasmids. Therefore, these two parts of PdhS cannot carry out separately the essential functions missing in the $\Delta pdhS$ strain, even if these parts of PdhS are functional in other tests, such as Y2H and subcellular localization (see below). Because of our inability to obtain a null mutant for *pdhS* and the current absence of molecular tools allowing the construction of depleted strains in *Brucella* spp, we decided to study the effects of its overexpression. Indeed, overexpressing an essential gene may give important information about its functions, as it was successfully performed with the *ctrA* gene of *B. abortus* (Bellefontaine *et al*, 2002). Overexpression of *pdhS* generated the characteristic Y-shaped phenotype, but also a high proportion of minicells in comparison to the WT strain (Figure 3B). This minicell phenotype was very well described in *Escherichia coli* (de Boer *et al*, 1989), where it is due to the alteration of the MinCDE system, encoded by the *minB* operon. Given that (i) the *minB* operon is a putative target of CtrA in *B. abortus* (Bellefontaine *et al*, 2002), (ii) CtrA proteolysis could be under the control of the DivK regulatory network, as it is the case in *C. crescentus* (Hung and Shapiro, 2002), and (iii) PdhS interacts with DivK and could therefore control its activity, we evaluated the abundance of CtrA in a *pdhS*⁺⁺ strain using immunoblot analysis with anti-CtrA antibodies. The CtrA level was lower in *pdhS*⁺⁺ strain compared with WT control (Figure 3C), suggesting that CtrA abundance is indeed under the control of PdhS.

Altogether, these results suggest that PdhS has essential functions in controlling some aspects of the *B. abortus* division process, maybe through the control of CtrA activity.

PdhS* is localized at one pole in *B. abortus

The homology of *B. abortus* PdhS, PleC and DivJ with the *C. crescentus* HK PleC and DivJ prompted the question of whether these *B. abortus* proteins also display spatial regulation in *B. abortus*. To address this question, we fused the CDS of *pleC*, *divJ* and *pdhS* to *yfp* on the pRH011 suicide vector and introduced these constructions into the *B. abortus* 544 WT strain. After a single recombination event at the corresponding loci, the translational fusions were expressed from the native promoters (XDB1105, XDB1107 and XDB1104 strains, respectively). Using fluorescence microscopy, we observed that PdhS-YFP accumulated at one pole in more than 90% of the cells (Figure 4A). PleC-YFP was not polar in *B. abortus*. However, surprisingly we observed that PleC-YFP was able to localize either at mid-cell or at new poles (Figure 4B). This ambiguity is due to the resolution of fluorescence microscopy, as we cannot determine whether PleC-YFP appears before or during the separation of daughter cells. The same localization patterns were observed when PdhS or PleC was fused to other fluorescent proteins (CFP and eGFP), or when these translational fusions were expressed from low-copy

plasmids (data not shown). The PdhS localization pattern was also the same in the XDB1109 strain, in which the only copy of *pdhS* expressed was the *pdhS-yfp* fusion (data not shown). The fact that this strain is viable and does not present any apparent morphological defects or growth delay demonstrates that YFP fusion at the C terminus of PdhS is not affecting PdhS essential functions. Control immunoblots with anti-GFP and anti-PdhS antibodies performed on the XDB1109 strain revealed that the only protein detected was PdhS-YFP, and that this fusion protein was stable (data not shown). Finally, DivJ-YFP did not accumulate at any particular sub-cellular location and appeared diffused when examined by fluorescence microscopy (data not shown).

From pictures presented in Figure 4A, we hypothesized that PdhS-YFP dynamically changes its spatial distribution during the *B. abortus* cell cycle. To investigate this possibility, we performed time-lapse fluorescence microscopy on XDB1104

strain as illustrated in Figure 4C. The PdhS-YFP fluorescent signal was concentrated at one pole. Following several cells in the time-lapse experiment allowed us to determine that PdhS-YFP was accumulating at the old pole of the large cells, as opposed to the new pole originating from the last cell

Table II *pdhS* is an essential gene in *B. abortus*

Strains ^a	pRH003			
	—	<i>pdhS</i>	<i>pdhS</i> _{611–1035}	<i>pdhS</i> _{1–613}
Wild type	100	96	100	94
$\Delta pdhS$	0	98	0	0

^aThe wild-type and $\Delta pdhS$ strains contained plasmid pRH232 (pRH002-*pdhS*) before swap experiments. Values are expressed as percentages of swapping plasmid pRH232 (clones Amp^R/Cm^S, *n* = 100) in WT and $\Delta pdhS$ backgrounds.

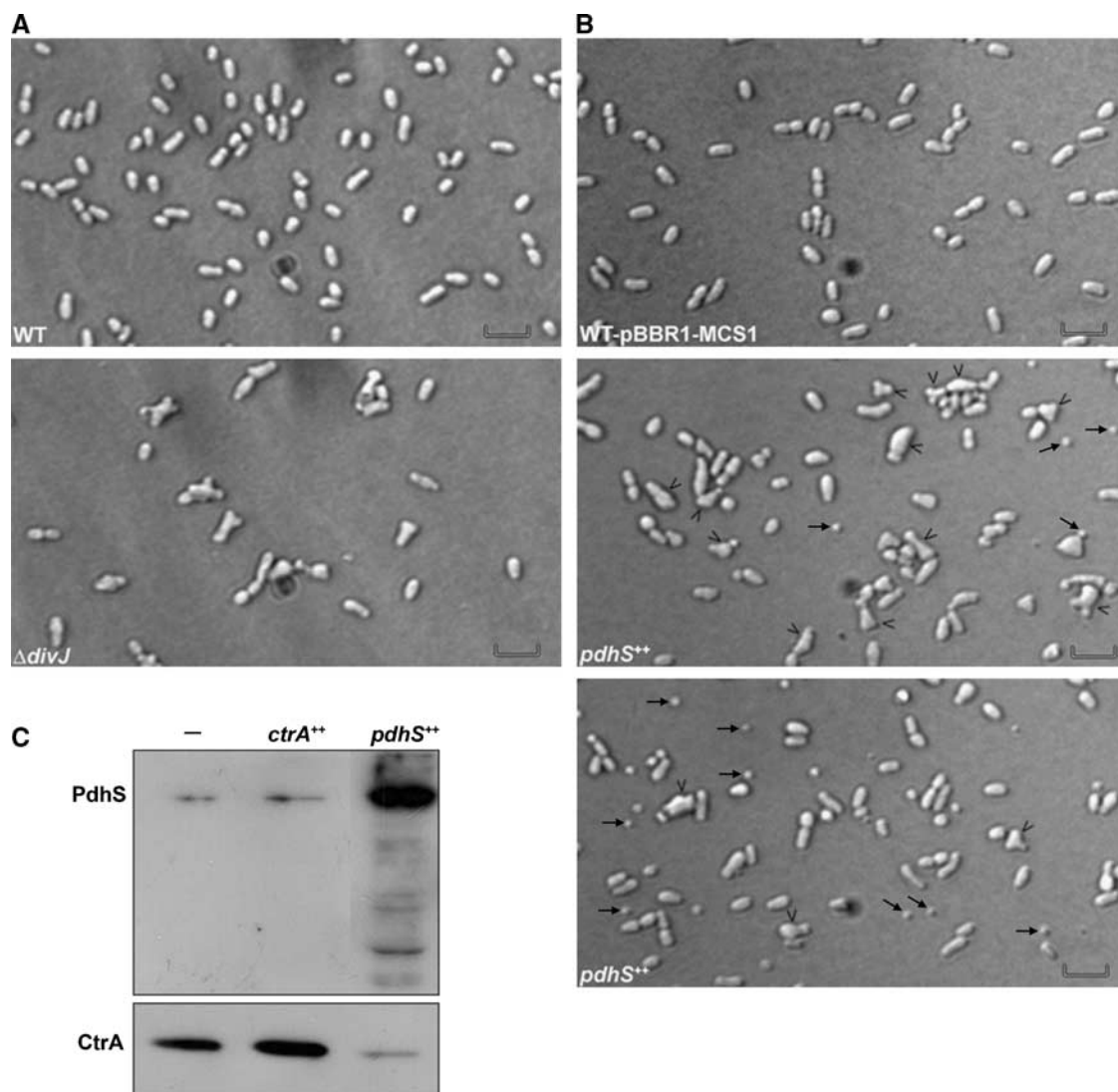


Figure 3 Morphotypes of the $\Delta divJ$ and *pdhS* overexpressing strains. (A) DIC micrographs of the WT *B. abortus* 544 (WT) and $\Delta divJ$ (XDB1102) strains from mid-exponential cultures. Scale bar, 2 μ m. (B) DIC micrographs of the WT *B. abortus* 544 strain bearing the empty plasmid pBBR1-MCS1 (WT pBBR1-MCS1, upper panel) and overexpressing *pdhS* (*pdhS*⁺⁺, middle and lower panels). Black arrows indicate minicells. Black arrowheads point to cells with abnormal morphology. Scale bar, 2 μ m. (C) Western blot analysis of relative CtrA and PdhS protein levels in strains overexpressing *ctrA* (*ctrA*⁺⁺) and *pdhS* (*pdhS*⁺⁺) in comparison to the wild-type strain (—). '—' Represents the empty vector pBBR1-MCS1 (Kovach *et al*, 1995) in the WT strain.

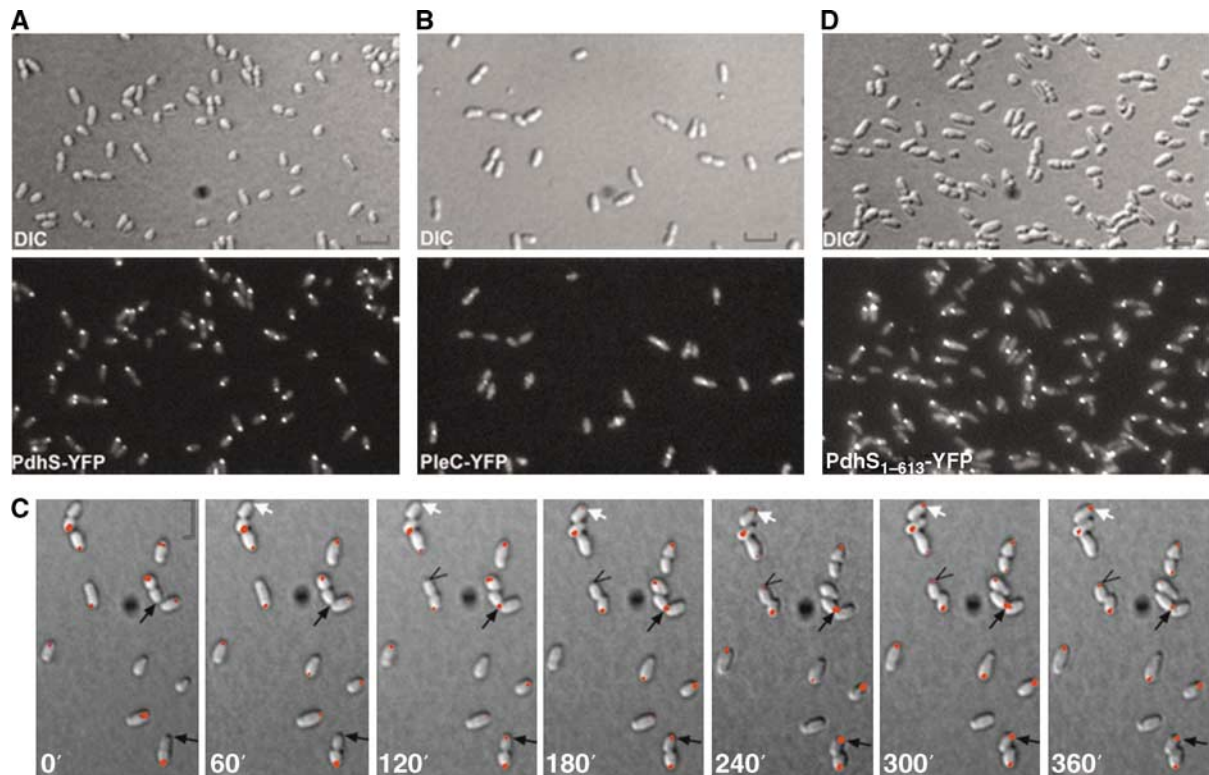


Figure 4 PdhS is dynamically localized at one pole of *B. abortus* through its N-terminal domain, whereas PleC localizes at mid-cell position. (A) PdhS localizes at one pole of *B. abortus*. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* cells producing PdhS-YFP (XDB1104 strain). (B) BaPleC localizes at mid-cell in *B. abortus*. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* cells producing PleC-YFP (XDB1105 strain). (C) PdhS dynamically localizes at the old pole of *B. abortus* cells. A time-lapse microscopy experiment was performed on the XDB1104 strain expressing *pdhS-yfp* by taking DIC and corresponding fluorescence images each 60 min. Arrows show that polar fluorescence signal appears 60–120 min following the physical separation of the daughter cells. (D) The N-terminal domain of PdhS is important for its polar localization. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* cells producing PdhS_{1–613}-YFP from the low-copy plasmid pRH407. Scale bar, 2 μ m.

division. As the cells grew, PdhS-YFP remained localized at the old pole until cell division was initiated. It is only after a short time (about 60–120 min) following cell separation that PdhS-YFP accumulated at the old pole of the small sibling cells (arrows in Figure 4C). The same time-lapse sequence with separated DIC and fluorescence fields is presented in Supplementary Figure S8. Because of the very low growth rate of *B. abortus* on an agarose pad at room temperature, we could not follow more than one cell-cycle equivalent per time-lapse experiment. These results strongly suggest that PdhS-YFP accumulated at the old pole of *B. abortus* only when the small progeny has differentiated into a stage corresponding to the large cell.

The N-terminal portion of PdhS is sufficient for its polar localization

As it was demonstrated for several polarly localized HK that their N-terminal part was involved in their subcellular localization (Jacobs *et al*, 1999; Sciochetti *et al*, 2002), we investigated the possibility that the large N-terminal part of PdhS is sufficient for its polar localization. For this purpose, we expressed the N-terminal (aa 1–613) part of PdhS in fusion to YFP from the low-copy plasmid pRH407. As illustrated in Figure 4D, PdhS_{1–613}-YFP was able to localize at one pole of *B. abortus* despite the fact that the PAS, HisKA and HATPase_c predicted domains were absent. The same

results were obtained with the XDB1108 strain, in which *pdhS*_{1–613}-yfp was integrated at the *pdhS* locus (data not shown). These results suggest that the N-terminal domain of PdhS is sufficient for polar localization in *B. abortus*. As the N-terminal domain of PdhS is able to interact with the full-length PdhS (Figure 2B) and a full-length copy of PdhS is always present in all our strains because of the essentiality of *pdhS* (Table II and data not shown), it is possible that the PdhS_{1–613}-YFP fusion is polarly localized through its interaction with the polar PdhS WT copy. However, the same N-terminal domain of PdhS fused to CFP (PdhS_{1–613}-CFP) is polarly localized in *C. crescentus* (data not shown), which does not carry a close ortholog of *pdhS*. Taken together, our data indicate that the N-terminal domain of PdhS is sufficient for polar localization in *C. crescentus* and *B. abortus*.

PdhS colocalizes with DivK at one pole in *B. abortus*

As PdhS can physically interact with DivK and both proteins localize at one pole in *B. abortus*, we postulated that DivK and PdhS colocalize at the same pole, at least in a fraction of *B. abortus* cells. To test this possibility, we introduced the low-copy plasmid pRH324 producing PdhS-CFP into the XDB1106 strain expressing a *divK-yfp* fusion at the *divK* locus. We observed that DivK-YFP is located at the same pole as PdhS-CFP (Figure 5), which is expected if PdhS is a kinase or a phosphatase of DivK. Moreover, if PdhS controls

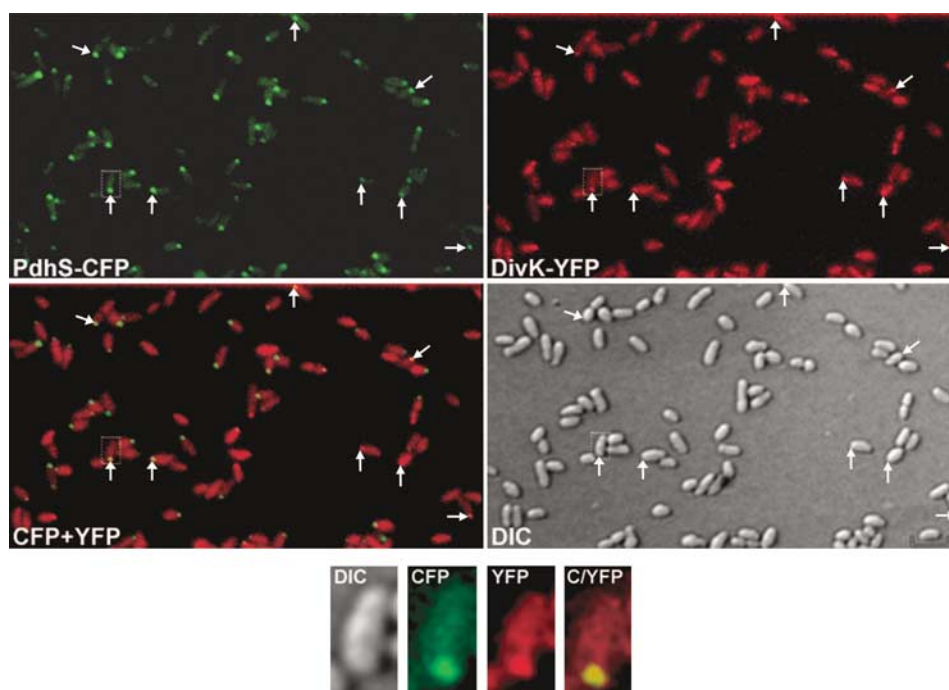


Figure 5 DivK colocalizes with PdhS at one pole of *B. abortus*. DIC and corresponding fluorescence images were taken with *B. abortus* cells from strain XDB1106/pRH324, coexpressing *divK-yfp* (red) and *pdhS-cfp* (green). An overlaid image shows the colocalization of both proteins within same cells (yellow). White arrows indicate polar colocalization of PdhS and DivK. Scale bar, 2 μ m.

the phosphorylation state of DivK, we can predict that the overexpression of *pdhS* could increase or decrease the polar localization of DivK-YFP. Analysis of the subcellular pattern of DivK localization confirmed this prediction (Supplementary Figure S9). Indeed, compared to the WT control, the *pdhS* overexpression strain keeps the polar localization of a PdhS-YFP fusion and displays an increase of the polar fluorescence signal of a DivK-YFP fusion (Supplementary Figure S9). These results suggest that PdhS could enhance the phosphorylation of DivK and its subsequent polar localization.

The polar localization of PdhS is maintained during a cellular infection

B. abortus is a facultative intracellular pathogen that encounters different environments during its life cycle. We therefore tested the possibility that polar localization of PdhS would be strictly dependent upon environmental stimuli absent in infected cells. To this end, the localization pattern of PdhS-YFP (XDB1104 strain) was monitored after infection of bovine macrophages. At 48 h post-infection, a polar fluorescence signal was observed in nearly all intracellular bacteria (Figure 6A). In contrast, a *B. abortus* strain expressing a transcriptional fusion between the *pdhS* promoter and *gfp* (*PpdhS-gfp*) gave a uniform and cytoplasmic fluorescence signal after 48 h of macrophage infection (Figure 6B), suggesting that the dots observed in Figure 6A represent the subcellular localization of PdhS-YFP. These observations indicate that at this stage of infection, which corresponds to a high rate of intracellular replication, PdhS-YFP is polarly localized, as in the case of *B. abortus* growth in bacteriological culture medium. These results suggest that the spatial distribution of PdhS is an intrinsic feature of PdhS rather than

a physiological response to environmental stimuli encountered by *B. abortus*.

PdhS is polarly localized in other α -proteobacteria

Recently we described that besides *C. crescentus*, at least three other α -proteobacteria (*S. meliloti*, *A. tumefaciens* and *B. abortus*) divide asymmetrically by generating two progeny cells of different size (Hallez *et al*, 2004). PdhS has close homologs in both *S. meliloti* and *A. tumefaciens*, that is, predicted large (> 1000 aa) and cytoplasmic HK sharing 43% identity with PdhS over their whole length (Hallez *et al*, 2004). We investigated the possibility that *B. abortus* PdhS could be polarly localized in species other than *B. abortus*, for example, being associated with a polar structure conserved in α -proteobacteria. To test this hypothesis, we introduced the low-copy plasmid pRH324 expressing *B. abortus* *pdhS* fused to *cfp* into *S. meliloti*. Interestingly, we found that PdhS-CFP also accumulated at one pole in *S. meliloti*, probably the old pole of the large cells (Figure 7A). This pattern of localization is similar to the one described for *B. abortus* (Figure 4C). In addition, we also observed that the same *pdhS-cfp* fusion expressed in *C. crescentus* accumulated fluorescence at the stalked pole (Figure 7B). Using a timecourse fluorescence microscopy experiment performed on a synchronized population of *C. crescentus*, we observed that PdhS-CFP (i) remained associated with the stalked pole during all the cell-cycle stages and (ii) accumulated at the flagellated pole, but only after a short time following cytokinesis (data not shown). Altogether, these results suggest that PdhS recognizes a polar structure conserved in several α -proteobacteria, even those lacking a close PdhS homolog except PleC and DivJ, such as *C. crescentus* (Hallez *et al*, 2004). These data also suggest that the old pole of a large cell of *B. abortus* and

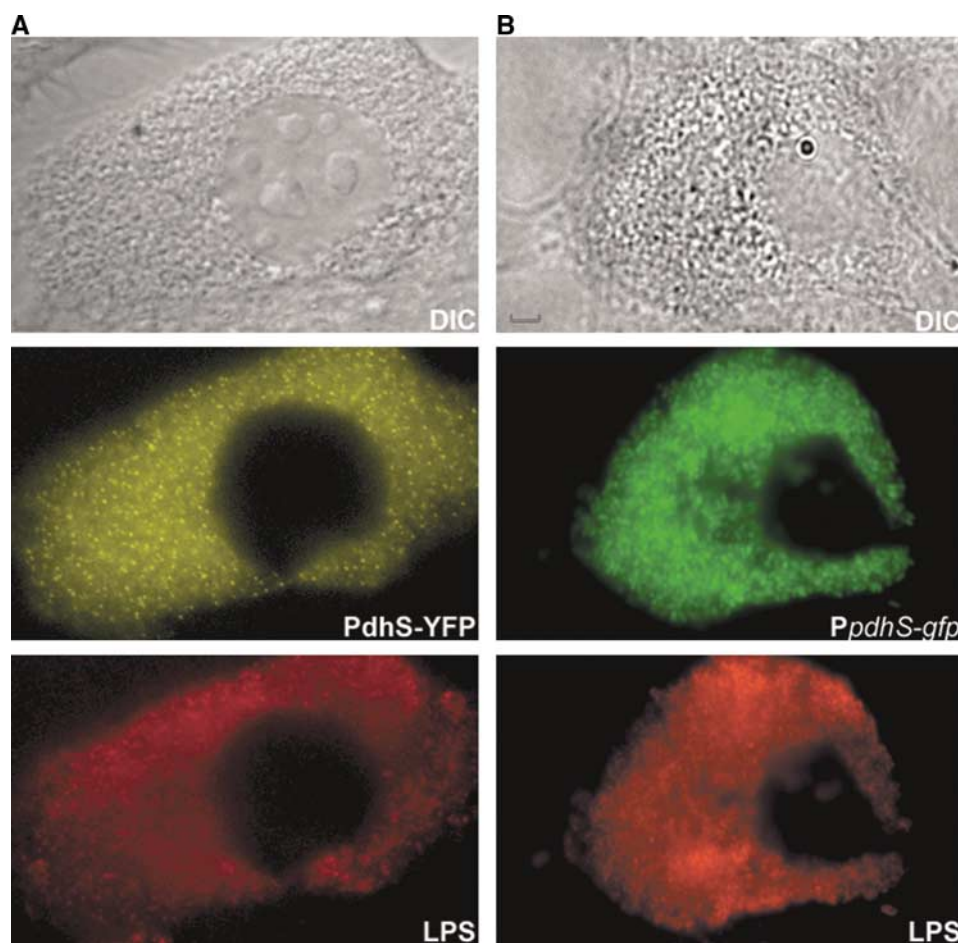


Figure 6 PdhS localizes at one pole of *B. abortus* cells during cellular infection. (A) DIC and corresponding fluorescence images were taken with bovine macrophages after 48 h of infection by the *B. abortus* strain expressing *pdhS-yfp* (XDB1104). (B) DIC and corresponding fluorescence images were taken with bovine macrophages after 48 h of infection by the *B. abortus* WT strain expressing the transcriptional fusion *PpdhS-gfp* from the plasmid pRH295. The LPS, representing the immunolabelling of the *B. abortus* lipopolysaccharide, the PdhS-YFP and the *PpdhS-gfp* fluorescence signals are shown in red, yellow and green, respectively. Scale bar, 2 μ m.

the old pole of a *C. crescentus* stalked cell (i.e. stalked pole) share evolutionarily conserved characteristics.

Discussion

In this report, we describe the characterization of PdhS, a bacterial HK with unusual features. Indeed, it is much larger than other HK, cytoplasmic and essential. In bacteria, the majority of HK are integral membrane proteins. It is therefore not surprising that 18 out of 22 predicted HK of *B. abortus* comprise putative transmembrane segments. Besides PdhS, the CckA homolog, which in *C. crescentus* is anchored to the membrane and required for CtrA phosphorylation (Jacobs *et al*, 1999, 2003), seems to be also cytoplasmic in *B. abortus* (Supplementary Figure S3). Essential HK are rather rare, as exemplified by the analysis of complete sets of knockout *B. subtilis* and *E. coli* strains, which revealed that there are, respectively, only one and none essential HK (Kobayashi *et al*, 2003; Baba *et al*, 2006). On the other hand, the systematic analysis of two-component signal transduction systems in *C. crescentus* identified four essential HK out of 62 (Skerker *et al*, 2005). Interestingly, two of these four essential HK, CckA and DivL are involved in the CtrA regulatory pathway. It is possible that the essential functions of PdhS in *B. abortus* is also dependent on CtrA. In *S. meliloti*,

the closer *pdhS* homolog, called *cbrA*, is not essential (Gibson *et al*, 2006) and is involved in succinoglycan production. However, as previously suggested (Hallez *et al*, 2004), there are two PdhS homologs in *S. meliloti*, a long form (PdhS1) and a short one (PdhS2), and it is possible that these two proteins have redundant functions.

The functions of PdhS remain to be elucidated in detail, but it is likely that PdhS is involved in cell division control, as *pdhS*⁺⁺ strain exhibits cell cycle defects, including minicells. In *E. coli*, the *minB* operon encodes MinC, MinD and MinE proteins, and alterations of the *minB* operon produce minicells (de Boer *et al*, 1989). This is particularly interesting as PdhS is expected to control DivK phosphorylation, itself probably involved in the regulation of CtrA, a transcriptional regulator of the *minB* operon. Indeed *B. abortus* His₆-CtrA is able to bind to several sites in the *minB* promoter (Bellefontaine *et al*, 2002), and the level of a MinE-GFP-tagged protein is lower in a *ctrA*⁺⁺ strain (R Hallez, unpublished data). In *B. abortus*, the products of the *minB* operon probably play a similar role than their counterparts in *E. coli*, as it was recently shown that a MinD-GFP fusion is able to oscillate from pole to pole (Hallez *et al*, 2007). PdhS probably controls the activity of CtrA indirectly. Indeed, it was recently demonstrated in *C. crescentus* that the DivJ/PleC/DivK pathway controls the activity of CtrA through the control of the

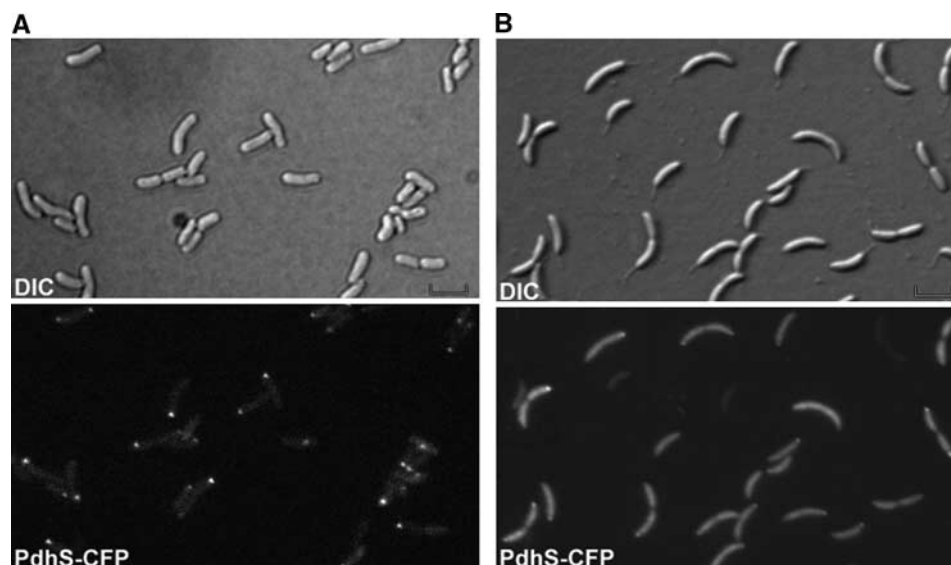


Figure 7 PdhS localizes at one pole of *S. meliloti* cells and at the stalked pole of *C. crescentus* cells. DIC and corresponding fluorescence images were taken with *S. meliloti* (A) or *C. crescentus* (B) cells producing PdhS-CFP from the low-copy plasmid pRH324. Scale bar, 2 μ m.

CckA/ChpT phosphorelay, which itself regulates the phosphorylation and proteolytic turnover of CtrA (Biondi *et al*, 2006). The signal sensed by PdhS is unknown, it may be intracellular as PdhS is cytoplasmic and its subcellular distribution is maintained during both extra- and intracellular lifestyles of *B. abortus*.

Another particularity of PdhS is its polar localization in *B. abortus*. The asymmetric distribution of PdhS in the late predivisional cells implies that only the bigger cells inherit polar PdhS. The nature of the segregated functions of PdhS is presently unknown, but by homology to *C. crescentus* and *S. meliloti*, it is likely that DivK phosphorylation and/or distribution is affected by PdhS. Four observations are in favor of this hypothesis: (i) polar localization of DivK is dependent on its phosphorylation state, as the D53A mutation abolished the ability of DivK to localize at the pole(s), (ii) the phosphorylation-dependent localization of DivK is not under the control of PleC or DivJ, two other HK interacting with DivK in the Y2H test, as DivK-YFP remains associated with the pole(s) of *B. abortus* $\Delta pleC$ and $\Delta divJ$ cells, (iii) DivK interacts with PdhS in a Y2H experiment (Figure 2) and (iv) in the cells where DivK-YFP is associated to one pole, PdhS-CFP colocalizes with it at the same pole (Figure 5). PdhS, therefore, constitutes the most likely candidate for the control of phosphorylation and/or distribution of DivK. However, we cannot exclude the possibility that DivJ and PleC act as phosphatases of DivK in *B. abortus*, which should lead to the accumulation of DivK at the pole(s) for example, or yet that both these HK control the phosphorylation state of DivK in other circumstances (e.g. in other culture media or during intracellular infection). Unexpectedly, after division, the small cells are mostly devoid of polar PdhS and as *pdhS* is essential, it is possible that the small cells are not able to enter into a new cell cycle as such, that is, without PdhS polarly localized. It would therefore be likely that the small cells must mature, which would include the presence of PdhS at one pole, before being able to produce progeny cells. This model is analogous to the one described for *C. crescentus* (Figure 8). Indeed, the *C. crescentus* swarmer cells must differentiate into stalked cells to become competent for

replication and division (Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003; Quardokus and Brun, 2003). From the model proposed in Figure 8, it is also striking that *B. abortus* PdhS presents a subcellular localization very similar to the one described for DivJ in *C. crescentus*. However, $_{cc}$ DivJ and the N-terminal part of PdhS do not share detectable similarity. The presence of a supplemental HK potentially controlling the DivK activity suggests an evolutionary plasticity for this regulatory network. On the other hand, despite the fact that PleC is the most conserved HK of DivK (Hallez *et al*, 2004), it does present a completely different subcellular localization in *B. abortus* and *C. crescentus* (Figure 8), again illustrating the malleability of this network in the course of evolution.

As *B. abortus* PdhS is able to be polarly localized in *S. meliloti* and *C. crescentus*, it is likely that a conserved structure anchoring PdhS to the pole is present in these bacteria. PdhS-YFP or PdhS-CFP is not polarly localized in *E. coli* (J Mignolet, unpublished data). The nature of the polar anchoring structure remains to be discovered. The conservation of such a structure indicates that polar specialization, that is, the anchoring of particular functions to a bacterial cell pole, may be an evolutionarily ancient trait, maybe already present in the ancestor(s) of α -proteobacteria. This would mean that bacterial differentiation is probably not a recent acquisition in the course of evolution. Interestingly, conservation of polar localization of a protein between bacterial and eukaryotic species has been described for the *B. subtilis* DivIVA protein, which is targeted to the poles of both *E. coli* and notably *Schizosaccharomyces pombe* cells (Edwards *et al*, 2000).

The fact that PdhS localization is maintained during an intracellular infection indicates that polar specialization suggested here is not restricted to *B. abortus* grown in bacteriological culture medium. Furthermore, polar structures may be required for the appropriate function of virulence factors. Indeed, it was reported that all *A. tumefaciens* VirB proteins are polarly localized (Judd *et al*, 2005).

In several cell types, *Brucellae* invade and replicate in professional and non-professional phagocytes by inhibiting fusion between phagosome and lysosome, and subsequently

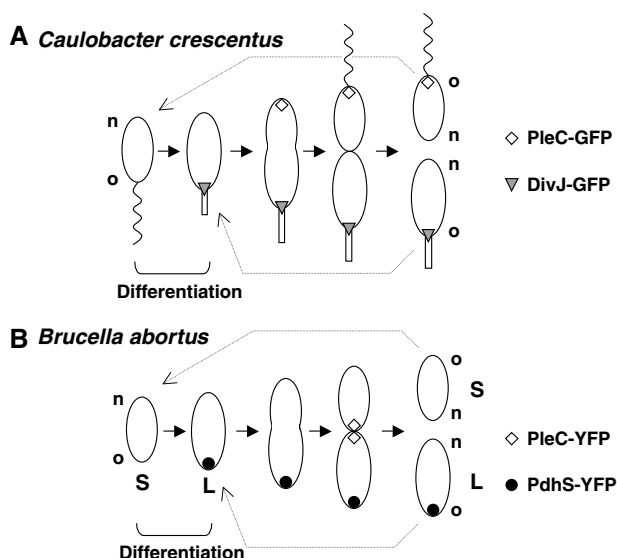


Figure 8 Hypothetical model for *B. abortus* cell cycle (A) compared with *C. crescentus* (B). The localization of PdhS and PleC is shown for *B. abortus*, whereas the localization of PleC and DivJ is shown for *C. crescentus*. The small (S) and large (L) cells are annotated for *B. abortus*. Old (o) and new (n) poles are indicated for *B. abortus* and *C. crescentus*.

creating an intracellular niche inside which they replicate (Gorvel and Moreno, 2002; Celli *et al*, 2003). When intracellular *Brucellae* avoid fusion with phago-lysosomes, they do not replicate. A possible reason would be that only the smaller progeny cells are able to successfully internalize phagocytes and deviate the intracellular traffic. Once the small cells reach the replication niche, they could differentiate into larger ones capable of initiating active replication. This would be in keeping with the fact that the small *B. abortus* cells correspond to the swarmer cells of *C. crescentus*, which are not competent for replication and must differentiate into stalked cells before initiating a new round of replication. It could also be proposed that several cell types have different functions regarding the control of the host immune response. The specific functions of each *B. abortus* daughter cell will have to be studied further. Identifying *Brucella* spp proteins specifically located in one cell type or at one cell pole could help in discovering functions segregated in the different cell types. The availability of the complete collection of all the *B. melitensis* predicted coding sequences (Dricot *et al*, 2004) constitutes a powerful post-genomic resource for such identifications.

Asymmetric division was also observed in other host-associated bacteria such as *A. tumefaciens* and *S. meliloti* (Hallez *et al*, 2004). The work performed by Lam *et al* (2003) to describe the subcellular localization of $_{SM}DivK$ in *S. meliloti* and the evidence that PdhS-CFP is present at one pole (probably the old pole of the large cells) in *S. meliloti* (Figure 7A) support the functionality of the asymmetric division of this symbiont. As *Sinorhizobium* spp is also an intracellular bacterium like *Brucella* spp, it is tempting to speculate that cell types generated by asymmetric division play different role(s) for establishing the complex host-bacteria relationship. Moreover, it is known that *S. meliloti* goes through a differentiation program during its intracellular lifestyle, that is, the formation of bacteroids indispensable for symbiosis establishment,

suggesting that more than two cell types may be produced by this bacterium.

In conclusion, PdhS is the first polar differentiation marker identified in *B. abortus*, a bacterium that was not suspected to undergo asymmetric division until recently (Hallez *et al*, 2004). This suggests that cellular differentiation may be much more widespread than previously expected in the prokaryotic world.

Materials and methods

Strains, plasmids and media

All *Brucella* strains used in this study (Supplementary Table SII) were derived from *B. abortus* 544 Nal^R (spontaneous nalidixic acid-resistant mutant), and were routinely cultivated in 2YT. *C. crescentus* CB15N was grown in peptone-yeast extract (PYE complex media). *S. meliloti* was grown in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with 2.5 mM MgSO₄ and 2.5 mM CaCl₂. *E. coli* strains DH10B (Invitrogen Life-Technologies), DB3.1 (Invitrogen Life-Technologies), S17-1 (Simon *et al*, 1983), DH5 (Bethesda Research Laboratories) and MT616 (Finan *et al*, 1986) were cultivated in LB broth. Antibiotics were used at the following concentrations when appropriate: nalidixic acid, 25 µg/ml; kanamycin, 20 µg/ml; chloramphenicol, 20 µg/ml; ampicillin, 100 µg/ml; gentamicin, 50 µg/ml. Plasmids (Supplementary Table SII) were mobilized from *E. coli* strain S17-1 into *B. abortus* and *C. crescentus* by bacterial conjugation (Ely, 1991), and from *E. coli* strain DH5 into *S. meliloti* by triparental mating, as described previously by Glazebrook and Walker (1991). Growth media and yeast genetic techniques have been described previously (Sherman, 1991). Full details about the Y2H assays are available in Supplementary data.

Molecular techniques

DNA manipulations were performed according to standard techniques (Ausubel, 1989). The mode of construction of strains and plasmids (Supplementary Table SII) as well as the sequences of all primers is available in Supplementary data and in Supplementary Table SI, respectively.

Plasmid swap experiment

To demonstrate the essentiality of *pdhS*, we developed a plasmid swap experiment (Table II) based on the instability of two vectors from the same incompatibility group in the same bacterial population. For this, we first introduced by conjugation the plasmid pBBR1-MCS4 and the pRH003 derivatives named pRH404, pRH405 and pRH406 (all derived from the pBBR1-MCS4 vector encoding resistance to ampicillin) into *B. abortus* 544 WT/pRH232 and *B. abortus* 544 $\Delta pdhS$ /pRH232 (XDB1103) strains. We selected only the presence of pRH003-derived vectors with ampicillin. Then three independent clones for each strain were cultivated in the presence of ampicillin without chloramphenicol (required for the selection of pRH232) during at least 10 generations and the cultures were on 2YT plates with ampicillin. Then, 100 colonies for each clone of each strain were replicated onto 2YT-Amp and 2YT-Cm. Values presented in Table II represent percentages of chasing plasmid pRH232 (clones Amp^R/Cm^S, *n* = 100).

Preparation of PdhS antibodies and immunoblotting experiments

N-terminally hexahistidine-tagged PdhS lacking the first 610 N-terminal residues was expressed from the pET-15b vector (Novagen) in *E. coli* BL21 (DE3) and purified as previously described (Bellefontaine *et al*, 2002). Purified His-tagged protein was used as an antigen to generate antibodies in rabbits as described for anti-CrA antibodies production (Bellefontaine *et al*, 2002).

Western blot analysis was carried out as described previously (Dozot *et al*, 2006) with anti-PdhS and anti-CrA sera at a dilution of 1/3000 and 1/2000, respectively. The monoclonal antibody anti-GFP (JL8, BD Biosciences) was used at a dilution of 1/1000 to check the stability of translational fusions to CFP, YFP and eGFP.

Microscopy

For fluorescence imaging, cell populations of *B. abortus*, *C. crescentus* or *S. meliloti* strains were placed on a microscope

slide that was layered with a pad of 1% agarose containing PBS (Jacobs et al, 1999). Time-lapse microscopy was performed by placing strain XDB1104 on a microscope slide that was layered with a pad of 1% agarose containing 2YT-rich medium. These slides were placed on a microscope stage at room temperature (approximately 22°C). Samples were observed on a Nikon E1000 microscope through a differential interference contrast (DIC) ×100 objective with a Hamamatsu Orca-ER LCD camera. Images were taken and processed with Simple PCI (Hamamatsu).

Cellular infections and immunofluorescence labelling

Infections of bovine macrophages SV40 (Stabel and Stabel, 1995) by *B. abortus* XDB1104 strain were performed as described previously (Delrue et al, 2001). Anti-*Brucella* LPS O-chain monoclonal antibody 12G12 (Clockaert et al, 1993) was used. The secondary antibody used was Texas red-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes).

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

References

- Ausmees N, Jacobs-Wagner C (2003) Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 225–247
- Ausubel FM (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 1–8
- Bellefontaine AF, Pierreux CE, Mertens P, Vandenhoute J, Letesson JJ, De Bolle X (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**: 945–960
- Biondi EG, Reisinger SJ, Skerker JM, Arif M, Perchuk BS, Ryan KR, Laub MT (2006) Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* **444**: 899–904
- Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**: 58–64
- Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**: 545–556
- Clockaert A, Zygmunt MS, Dubray G, Limet JN (1993) Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* **139**: 1551–1556
- de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**: 641–649
- Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ (2001) Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**: 487–497
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujic C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 443–448
- Dozot M, Boigegrain RA, Delrue RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, Danese I, Letesson JJ, De Bolle X, Kohler S (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell Microbiol* **8**: 1791–1802
- Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, Hao T, Lambert C, Hallez R, Delroisse JM, Vandenhoute J, Lopez-Goni I, Moriyon I, Garcia-Lobo JM, Sangari FJ, Macmillan AP, Cutler SJ, Whatmore AM, Bozak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Vidal M, Hill DE, Letesson JJ, De Bolle X (2004) Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**: 2201–2206
- Edwards DH, Thomaides HB, Errington J (2000) Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J* **19**: 2719–2727
- Ely B (1991) Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol* **204**: 372–384
- Errington J (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **1**: 117–126
- Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* **167**: 66–72
- Gibson KE, Campbell GR, Lloret J, Walker GC (2006) CbrA is a stationary-phase regulator of cell surface physiology and legume symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 4508–4521
- Glazebrook J, Walker GC (1991) Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. *Methods Enzymol* **204**: 398–418
- Gorvel JP, Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**: 281–297
- Hallez R, Bellefontaine AF, Letesson JJ, De Bolle X (2004) Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**: 361–365
- Hallez R, Letesson JJ, Vandenhoute J, De Bolle X (2007) Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in *Brucella abortus*. *Appl Environ Microbiol* (in press)
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* **187**: 2715–2726
- Huguenel ED, Newton A (1982) Localization of surface structures during procaryotic differentiation: role of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Differentiation* **21**: 71–78
- Hung DY, Shapiro L (2002) A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13160–13165
- Jacobs C, Ausmees N, Cordwell SJ, Shapiro L, Laub MT (2003) Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol Microbiol* **47**: 1279–1290
- Jacobs C, Domian IJ, Maddock JR, Shapiro L (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**: 111–120

Acknowledgements

We are very grateful to R-M Genicot for generous technical assistance during cloning procedures and to C Nijskens for performing cellular infections. We also thank L Van Melderden and B NKengfac for critical reading of the manuscript. We thank the anonymous reviewers for their interesting comments and suggestions. This work was supported by FRFC (Fonds de la Recherche Fondamentale Collective, convention 2.4521.04). R Hallez was supported by a short-term fellowship from EMBO (European Molecular Biology Organization) and FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique) and by a Wood-Whelan research fellowship. R Hallez was holding a PhD fellowship from the FRIA (Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture). J Mignolet is holding a PhD fellowship from the FNRS.

Contributions

RH performed all the experiments except otherwise stated and JM contributed to the construction of *divJ* and *pleC* mutants, to the yeast two-hybrid presented in Figure 2 and to the construction of *gfp* fusions with *pdhS* and *pleC*. JM also tested PdhS-CFP localization in *S. meliloti* (Figure 7A). VVM and MW tested the interactions within and between two-component systems (Supplementary Figure S4). XDB, CJW, JLL and JV supervised the work.

- Jacobs-Wagner C (2004) Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol Microbiol* **51**: 7–13
- Judd PK, Kumar RB, Das A (2005) Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11498–11503
- Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Debarbouille M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Le Coq D, Masson A, Mauel C, Meima R, Mellado RP, Moir A, Moriya S, Nagakawa E, Nanamiya H, Nakai S, Nygaard P, Ogura M, Ohanan T, O'Reilly M, O'Rourke M, Pragai Z, Pooley HM, Rapoport G, Rawlins JP, Rivas LA, Rivolta C, Sadaie A, Sadaie Y, Sarvas M, Sato T, Saxild HH, Scanlan E, Schumann W, Seegers JF, Sekiguchi J, Sekowska A, Seror SJ, Simon M, Stragier P, Studer R, Takamatsu H, Tanaka T, Takeuchi M, Thomaidis HB, Vagner V, van Dijl JM, Watabe K, Wipat A, Yamamoto H, Yamamoto M, Yamamoto Y, Yamane K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H, Zuber U, Ogasawara N (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4678–4683
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop III RM, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176
- Lam H, Matroule JY, Jacobs-Wagner C (2003) The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**: 149–159
- Latch JN, Margolin W (1997) Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**: 2373–2381
- Laub MT, McAdams HH, Feldblyum T, Fraser CM, Shapiro L (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**: 2144–2148
- Matroule JY, Lam H, Burnette DT, Jacobs-Wagner C (2004) Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* **118**: 579–590
- Ohta N, Lane T, Ninfa EG, Sommer JM, Newton A (1992) A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10297–10301
- Ohta N, Newton A (2003) The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* **185**: 4424–4431
- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13148–13153
- Quardokus EM, Brun YV (2003) Cell cycle timing and developmental checkpoints in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 541–549
- Quon KC, Marczynski GT, Shapiro L (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83–93
- Sciochetti SA, Lane T, Ohta N, Newton A (2002) Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **184**: 6037–6049
- Sherman F (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**: 3–21
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* **10**: 783–791
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**: e334
- Stabel JR, Stabel TJ (1995) Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet Immunol Immunopathol* **45**: 211–220
- Wang SP, Sharma PL, Schoenlein PV, Ely B (1993) A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 630–634
- Wheeler RT, Shapiro L (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**: 683–694
- Wu J, Ohta N, Zhao JL, Newton A (1999) A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13068–13073

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Materials and Methods

Molecular Techniques

B. abortus 544 knock-out mutants were obtained by gene replacement. Briefly, for *B. abortus pleC* mutant strain ($\Delta pleC$), upstream and downstream regions flanking *pleC* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *B. abortus* 544 NaI^R genomic DNA using the following primer pairs: (i) *pleCup1* and *pleCup2*; (ii) *pleCdown1* and *pleCdown2*. A second PCR using primers *pleCup1* and *pleCdown2* permitted the association of the two PCR products. The final PCR product (*pleC* upstream/downstream) was inserted into the *Asp718I/BamHI* (underlined) sites of pSKoriT (I. Danese, unpublished) to generate pSKoriT- $\Delta pleC$. Then, the *nptII* Kan^R cassette was excised from pUC4K (Pharmacia) with *BamHI*, and subsequently cloned into the *BglII* unique site of pSKoriT- $\Delta pleC$ to generate plasmid pRH304. Finally, the $\Delta pleC::kan^R$ fragment was excised from pSKoriT- $\Delta pleC::kan^R$ by *KpnI/SacI* restriction and subsequently cloned into *KpnI/SacI*-cut pSKoriT-Cat (I. Danese, unpublished) to generate pRH309. For *B. abortus divJ* ($\Delta divJ$) and *pdhS* ($\Delta pdhS$) mutant strains, upstream and downstream regions flanking *divJ* and *pdhS* genes were amplified by PCR using the following primer pairs: (i) *divJup1* and *divJup2*; (ii) *divJdown1* and *divJdown2*; (i) *pdhSup1* and *pdhSup2*; (ii) *pdhSdown1* and *pdhSdown2*. A second PCR using primers *divJup1* and *divJdown2* or *pdhSup1* and *pdhSdown2* permitted the association of the PCR products. The final PCR products were cloned into pGEM-T Easy (Promega) to generate pGEM-T- $\Delta divJ$ and pGEM-T- $\Delta pdhS$, respectively. Finally, the $\Delta divJ$ and $\Delta pdhS$ fragments were excised from pGEM-T- $\Delta divJ$ and pGEM-T- $\Delta pdhS$ by *NotI* restriction and subsequently cloned into *NotI*-cut pJQ200-uc1 to generate pRH380 and pRH370, respectively.

These final constructions were transformed into *E. coli* strain S17-1, and introduced into *B. abortus* 544 NaI^R strain by conjugation. For *B. abortus pleC* mutant, clones for which a double recombination event occurred (Cm^s Kan^r) were selected, and their genotype was verified by PCR and Southern blot analysis. For *B. abortus divJ* mutant, we used the sucrose sensitivity to gram-negative bacteria conferred by the *sacB* gene present on the pJQ200-uc1 vector (Donnenberg and Kaper, 1991), hence allowing to apply selective pressure for allelic exchange which will then yield sucrose-resistant clones. For this purpose, following conjugation, brucellae were first plated in the presence of gentamycin for selecting transformants. Positive clones were cultivated in 2YT without gentamycin for more than 20 generations and plated onto solid medium containing 5% sucrose. Gentamycin-sensitive but sucrose-resistant colonies were isolated and gene replacement was confirmed by PCR. For *B. abortus pdhS* mutant, the same procedure was followed except that pJQ200-uc1- $\Delta pdhS$ (pRH370) was transferred into the *B. abortus*-pRH232 strain expressing *pdhS* *in trans* since this gene is essential.

All other plasmids used in this study (Table SII) were constructed by using the GatewayTM technique (Invitrogen). Since *B. abortus* and *B. melitensis* are nearly identical at the genomic level, entry clones were recovered from the *B. melitensis* ORFeome version 1.1 (Dricot et al., 2004) except for pRH402, pRH403, pRH198, pRH401, pRH191 and pRH196 which were constructed as follows: the corresponding DNA fragments were amplified by PCR from *B. abortus* 544 NaI^R genomic DNA with GatewayTM primers *pdhS-attB1* and *pdhS Δ C-attB2* (for *pdhS*₁₋₆₁₃); *pdhS Δ N-attB1* and *pdhS-attB2* (for *pdhS*₆₁₁₋₁₀₃₅); *pdivK-attB1* and *divK-attB2* (for

pdivK); *pdivJ-attB1* and *divJ-attB2* (for *pdivJ*); *pleC-attB1* and *pleC-attB2* (for *pleC**); *divJ-attB1* and *divJ-attB2* (for *divJ**) (Invitrogen Life-Technologies), and cloned in the entry vector pDONR201 as previously described (Dricot et al., 2004). LR recombination cloning procedure was performed as recommended by the manufacturer (Invitrogen Life-Technologies).

For plasmids used in the yeast two-hybrid assay, the so-called BD-X and AD-Y constructs are expressed from the bait plasmid pVV212 as C-terminal fusions to Gal4p₁₋₁₄₇ and from the prey plasmid pVV213 as C-terminal fusions to Gal4p₇₆₈₋₈₈₁, respectively. These pVV212 and pVV213 “destination vectors” are pGBT9 (Bartel et al., 1993) and pACT2 (Fromont-Racine et al., 1997) derivatives, respectively, compatible with the GatewayTM recombinational cloning technology, and were constructed as follows. The so-called rB cassette was recovered from the pSK-B vector (Van Mullem et al., 2003) on a 1.7 kb Eco RV fragment and subcloned at the *SmaI* site of pGBT9 and pACT2, to give pVV212 and pVV213, respectively. Construction and amplification of these destination vectors was performed in the *E. coli* DB3.1 strain (Invitrogen Life-Technologies), which is resistant to the toxic effects of the *ccbB* gene carried on the GatewayTM cassette. The GatewayTM recombinational cloning technology (Walhout et al., 2000) was used to insert the CDS of interest into the pVV212 and pVV213 “destination vectors”. LR cloning reactions were performed as recommended by the manufacturer (Invitrogen Life-Technologies). The LR reaction products were transformed into the DH10B strain, and plasmid DNA corresponding to each construct was purified from a pool of transformants.

Yeast Two-Hybrid Assays

Growth media and yeast genetic techniques have been described previously (Sherman, 1991). YPD was used as complete medium. SC-W and SC-L are respectively tryptophan and leucine omission media and were used to select MaV103 and MaV203 yeast strains transformed with recombinant pVV212 and pVV213 plasmids, respectively. SC-LW medium lacking both leucine and tryptophan was used to select diploids. SC-HLW + 50 mM 3-AT lacking histidine, leucine and tryptophan and containing 50 mM of 3-amino-1,2,4-triazole (3AT, Sigma) was used as selective medium to detect physical interactions.

BD-X constructs were transformed into MaV103 yeast strain. Transformants were grown at 30°C for three days on SC-W plates. To bring the BD-X constructs as well as negative control (empty pVV212) together onto the same plate, a pool of transformants of each construct was resuspended in 100 µl of sterile distilled water, and 5 µl of each suspension were dropped onto a single SC-W plate. Cells were grown at 30°C for one day.

AD-Y constructs were transformed into MaV203 yeast strain. Transformants were grown at 30°C for three days on SC-L plates. For each construct, a pool of transformants was resuspended in sterile distilled water, the suspension was plated on a SC-L plate, and cells were grown at 30°C for one day.

The following mating protocol was then used to combine each AD-Y fusion with all the BD-X constructs. A SC-L plate containing a single AD-Y fusion and a SC-W plate containing the BD-X fusions and the pVV212 negative control were replica-plated on a single YPD plate. The YPD plate was incubated overnight at 30°C to allow mating to occur. On the next day, the YPD plate was replica-plated onto a SC-LW medium, that was incubated at 30°C for one to two days to allow growth of the diploids. To assay expression of both *HIS3* and *lacZ* reporter genes, the plate containing the diploids was finally replica-plated on SC-HLW + 50 mM 3-AT and SC-LW, respectively. The former was incubated at 30°C and growth was monitored after 3-5 days. The

latter was incubated at 30°C for one day and tested for β -galactosidase production in an overlay plate assay (Flores et al., 1999).

***hk* and *rr* CDS Identification and Domain Predictions**

The CDS database of *B. melitensis* (<http://serine.urbm.fundp.ac.be/~seqbruce/GENOMES/>) was screened using the PFAM response-reg and trans_reg_C domains typical of response regulators, and the PFAM HATPase_C domain for histidine protein kinases. A E-value cutoff of 10^{-10} was chosen for this search (comparison of each CDS with the PFAM database). The CDS names (Figure S1) were attributed as follows: TcxR and TcxS for two component regulators and sensors, respectively, with x being a letter between a and f in the alphabetical order. Other names were attributed using data available in the literature (BvrRS, FeuPQ, NtrBC and NtrYX) (Dorrell et al., 1999; Dorrell et al., 1998; Foulongne et al., 2000; Lestrade et al., 2000; Sola-Landa et al., 1998) or using homologies (CenKR, PrrBA, NodVW, PrlSR, PleC, DivJ, DivL, DivK, PleD, CckA and CtrA). The PhoRB name was given from the data obtained in this study. The other names were given as follows: StcA for sigma54-dependent two-component activator, MdrR for monodomain response regulator, FtcR for flagellar two-component regulator and PdhS for PleC/DivJ homolog sensor (previously named *hk*₁₀₃₅ in (Bellefontaine et al., 2002)).

The domain composition of each protein was predicted using the Conserved Domain Database web site (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), with the PFAM database. The protein localization was predicted using the PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>). The TMHMM server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) was used to predict transmembrane segments.

Isolation of Cytoplasmic Fraction

Cytoplasmic fraction was isolated according to Sciochetti *et al.* (Sciochetti et al., 2005) as follows. Cells from 50-ml cultures grown to mid-exponential phase in 2YT medium were harvested and resuspended in 5 ml resuspension buffer (20 mM Tris 7.5, 25 mM EDTA, 5 M NaCl) containing complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Following incubation with lysozyme (250 μ g/ml, final) for 1 h, cells were disrupted by sonication. The cell lysates were centrifuged to remove unlysed cells at 5000 r.p.m. The supernatants were then centrifuged at 50 000 r.p.m. for three hours. One milliliter of the supernatant containing the cytoplasmic proteins was precipitated using 5% v/v trichloroacetic acid. The precipitated proteins were washed three times in resuspension buffer and resuspended in a final volume of 100 μ l.

Supplementary References

- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.
- Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1991) Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*, **59**, 4310-4317.
- Evinger, M. and Agabian, N. (1977) Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol*, **132**, 294-301.
- Flores, A., Briand, J.F., Gadai, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. and Werner, M. (1999) A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7815-7820.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*, **16**, 277-282.
- Niel, C., Guillaume, J.B. and Bechet, M. (1977) [Demonstration of 2 enzymes with beta-galactosidase activity in *Rhizobium meliloti*]. *Can J Microbiol*, **23**, 1178-1181.
- Quandt, J. and Hynes, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, **127**, 15-21.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. and Vandenhoute, J. (2003) Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast*, **20**, 739-746.
- Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. and Boeke, J.D. (1996) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10315-10320.
- Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol*, **328**, 575-592.

Table SI. Primers used in this study

Name	Sequence 5' to 3'
<i>pleCup1</i>	GGGGTACCCCGAAGAGGTGCGGCGCGAA
<i>pleCup2</i>	GGAATTCCGAAGATCTTCCATCTCTCGGCCCTCT
<i>pleCdown1</i>	GAAGATCTTCGGAATTCCTCGGCCGGTCTGTCACAAA
<i>pleCdown2</i>	CGGGATCCCGGCTGCGATAACACCCGTA
<i>divJup1</i>	GGGGTACCCCGGATCATGCCCTGTCTGTA
<i>divJup2</i>	GGAATTCCGAAGATCTTCATCATCGCCACGCCTGTA
<i>divJdown1</i>	GAAGATCTTCGGAATTCCTCGCAGCACGGCTCCTT
<i>divJdown2</i>	CGGGATCCCGATGTTCAACCGCCTCGCGGG
<i>pdhSup1</i>	GGGGTACCCCTCGAACGAGCCCCGACAA
<i>pdhSup2</i>	GGAATTCCGAAGATCTTCGCCCCGAGCGCTCCTTAA
<i>pdhSdown1</i>	CGGGATCCCGTTCCCCGCGTAGGCGCTT
<i>pdhSdown2</i>	CGGGATCCCGATGTTCAACCGCCTCGCGGG
<i>pdhS-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCAGGATCATACCCCTTCAT
<i>pdhSΔC-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGACCGGTTCTCGCTGCCAT
<i>pdhSΔN-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCCGGTCGATGCCCATCTGAA
<i>pdhS-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTCAGCCAGAACGCGGGTT
<i>pdivK-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCAGTCCGGAAGTAACGGAAT
<i>divK-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGCATCGCCCAGATAGGAC
<i>pdivJ-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGCGGTCCACTTTCCAATG
<i>divJ-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGCCGTTTTGCGGGTTT
<i>pleC-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACAGGATGCCGTGCTG
<i>pleC-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAGCAGCGTGGGTCCGGGC
<i>divJ-attB1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTTGAACGTCATTTCATTTGAAAGCAG
<i>divJ-attB2</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGCCGTTTTGCGGGTTT

Table SII. Strains and Plasmids

Strain	Relevant Genotype or Description	Reference or Source
<i>B. abortus</i>		
<i>B. abortus</i> 544 NaIR	<i>B. abortus</i> 544 wild-type strain	J-M. Verger
XDB1101	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta pleC::kanR$	This study
XDB1102	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta divJ$	This study
XDB1103	<i>B. abortus</i> 544 $\Delta pdhS/pRH232$	This study
XDB1104	<i>B. abortus</i> 544 $pdhS::pdhS-yfp$	This study
XDB1105	<i>B. abortus</i> 544 $pleC::pleC-yfp$	This study
XDB1106	<i>B. abortus</i> 544 $pdivK::pdivK-yfp$	This study
XDB1107	<i>B. abortus</i> 544 $pdivJ::pdivJ-yfp$	This study
XDB1108	<i>B. abortus</i> 544 $pdhS::pdhS_{1-613}-yfp$	This study
XDB1109	<i>B. abortus</i> 544 $pdhS::pdhS_{611-1035}-yfp$	This study
<i>C. crescentus</i>		
CB15N	Synchronizable variant strain of CB15	(Evinger and Agabian, 1977)
CJW744	CB15N $\Delta pleC$	C. Jacobs-Wagner
CJW403	CB15N $divK::\Delta divKW/pdivK-egfp$	(Lam et al., 2003)
<i>S. meliloti</i>		
GMI211	Sm ^R derivative of <i>S. meliloti</i> 1021	(Niel et al., 1977)
<i>E. coli</i>		
DH10B	Cloning strain	Invitrogen Life-Technologies
DB3.1	<i>ccdB</i> resistant cloning strain	Invitrogen Life-Technologies
S17-1	RP4-2, Tc::Mu,Km-Tn7, for plasmid mobilization	(Simon, 1983)
DH5	Donor strain	Bethesda Research Laboratories
MT616	Helper strain	(Finan et al., 1986)
<i>S. cerevisiae</i>		
MaV103	<i>MATa leu2-3, 112 trp-901 his3Δ200 ade2-1 gal4Δ gal80Δ SPAL10::URA3 GAL1::lacZ GAL1::HIS3-@LYS2 can1^R cyh2^R</i>	(Vidal et al., 1996)
MaV203	<i>MATα leu2-3112 trp-901 his3Δ200 ade2-1 gal4Δ gal80Δ SPAL10::URA3 GAL1::lacZ GAL1::HIS3-@LYS2 can1^R cyh2^R</i>	(Vidal et al., 1996)
Plasmid	Relevant Genotype or Description	Reference or Source
pRH304	pSKoriT carrying $\Delta pleC::kanR$	This study
pRH309	pSKoriT-Cat carrying $\Delta pleC::kanR$	This study
pJQ200-uc1	Genta ^R vector with <i>sacB</i>	(Quandt and Hynes, 1993)
pRH380	pJQ200-uc1 carrying $\Delta divJ$	This study
pRH370	pJQ200-uc1 carrying $\Delta pdhS$	This study
pDONR201	BP cloning vector	Invitrogen Life-Technologies
pRH189	pDONR201 carrying <i>ctrA</i>	This study
pRH190	pDONR201 carrying <i>divK</i>	This study
pRH198	pDONR201 carrying <i>pdivK</i>	This study
pRH199	pDONR201 carrying <i>divJ</i>	This study
pRH401	pDONR201 carrying <i>pdivJ</i>	This study
pRH192	pDONR201 carrying <i>pdhS</i>	This study
pRH200	pDONR201 carrying <i>pleC</i>	This study

pRH191	pDONR201 carrying <i>pleC</i> *	This study
pRH196	pDONR201 carrying <i>divJ</i> *	This study
pRH402	pDONR201 carrying <i>pdhS</i> ₁₋₆₁₃	This study
pRH403	pDONR201 carrying <i>pdhS</i> ₆₁₁₋₁₀₃₅	This study
pBBR1-MCS1	Cm ^R broad host range vector	(Kovach et al., 1995)
pBBR1-MCS4	Amp ^R broad host range vector	(Kovach et al., 1995)
pRH001	Gateway-compatible low copy vector	(Hallez et al., 2006)
pRH246	pRH001 carrying <i>pleC</i>	This study
pdivK-EGFP	pMR20 carrying <i>ccdivK-gfp</i>	(Lam et al., 2003)
pRH002	Gateway-compatible pBBR1-MCS1	(Hallez et al., 2006)
pRH222	pRH002 carrying <i>ctrA</i>	This study
pRH223	pRH002 carrying <i>divK</i>	This study
pRH232	pRH002 carrying <i>pdhS</i>	This study
pRH003	Gateway-compatible pBBR1-MCS4	(Hallez et al., 2006)
pRH404	pRH003 carrying <i>pdhS</i>	This study
pRH405	pRH003 carrying <i>pdhS</i> ₁₋₆₁₃	This study
pRH406	pRH003 carrying <i>pdhS</i> ₆₁₁₋₁₀₃₅	This study
pRH004	Gateway-compatible CFP low copy vector	(Hallez et al., 2006)
pRH324	pRH004 carrying <i>pdhS-cfp</i>	This study
pRH005	Gateway-compatible YFP low copy vector	(Hallez et al., 2006)
pRH336	pRH005 carrying <i>divK-yfp</i>	This study
pRH338	pRH005 carrying <i>pdhS-yfp</i>	This study
pRH337	pRH005 carrying <i>pleC-yfp</i>	This study
pRH407	pRH005 carrying <i>pdhS</i> ₁₋₆₁₃ - <i>yfp</i>	This study
pRH409	pRH005 carrying <i>divK</i> _{D53A} - <i>yfp</i>	This study
pRH011	Gateway-compatible YFP suicide vector	(Hallez et al., 2006)
pRH349	pRH011 carrying <i>pdhS-yfp</i>	This study
pRH348	pRH011 carrying <i>pleC-yfp</i>	This study
pRH347	pRH011 carrying <i>pdivK-yfp</i>	This study
pRH410	pRH011 carrying <i>pdivJ-yfp</i>	This study
pRH411	pRH011 carrying <i>pdhS</i> ₆₁₁₋₁₀₃₅ - <i>yfp</i>	This study
pVV212	Gateway-compatible BD_Gal4 vector	V. Van Mullem
pRH045	pVV212 carrying BD- <i>divK</i>	This study
pRH412	pVV212 carrying BD- <i>pdhS</i>	This study
pVV213	Gateway-compatible AD_Gal4 vector	V. Van Mullem
pRH086	pVV213 carrying AD- <i>divK</i>	This study
pRH117	pVV213 carrying AD- <i>divJ</i> *	This study
pRH119	pVV213 carrying AD- <i>pleC</i> *	This study
pRH413	pVV213 carrying AD- <i>pdhS</i>	This study
pRH414	pVV213 carrying AD- <i>pdhS</i> ₁₋₆₁₃	This study
pRH123	pVV213 carrying AD <i>pdhS</i> ₆₁₁₋₁₀₃₅	This study
pRH295	pBBR1-P <i>pdhS-gfp</i>	This study

Table SII

* Represents truncated forms of _{BA}PleC and _{BA}DivJ, which comprised the HATPase_C domain and excluded the predicted transmembrane domains

Figure S1

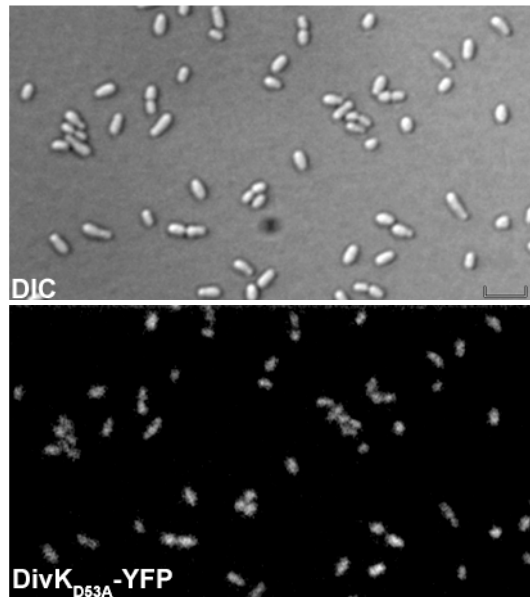


Figure S1. The polar localization of DivK in *B. abortus* is dependent upon its phosphorylation state

DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* wt cells producing DivK_{D53A}-YFP from the low copy plasmid pRH409

Name	No.	Prediction	Size of C-terminal fragment
TcaS	BMEI0370	HK	272 aa
TcaR	BMEI0372	RR	
TcbS	BMEI0492	HK	259 aa
TcbR	BMEI0493	RR	
TccS	BMEI1328	HK	282 aa
TccR	BMEI1329	RR	
TcdS	BMEI1583	HK	229 aa
TcdR	BMEI1582	RR	
TceS	BMEI0792	HK	264 aa
TceR	BMEI0791	RR	
TcfS	BMEI1015	HK	273 aa
TcfR	BMEI1014	RR	
NtrB	BMEI0865	HK	
NtrC	BMEI0866	RR	
NtrY	BMEI0867	HK	434 aa
NtrX	BMEI0868	RR	
PhoR	BMEI1624	HK	
PhoB	BMEI1984	RR	
PrrB	BMEI1816	HK	249 aa
PrrA	BMEI1811	RR	
FeuQ	BMEI1336	HK	260 aa
FeuP	BMEI1337	RR	
BvrS	BMEI2035	HK	291 aa
BvrR	BMEI2036	RR	
NodV	BMEI0052	HK	251 aa
NodW	BMEI0051	RR	
PrIS	BMEI1606	HKRR	704 aa
PrIR	BMEI1607	RR	
CenK	BMEI1648	HK	300 aa
StcA	BMEI0011	RR	
MdrR	BMEI0050	RR	
FtcR	BMEI0158	RR	
CenR	BMEI0066	RR	
PleC	BMEI1325	HK	544 aa
DivJ	BMEI1357	HK	423 aa
PdhS	BMEI0417	HK	
DivL	BMEI2027	HK	268 aa
DivK	BMEI0659	RR	
PleD	BMEI0660	RR	
CckA	BMEI0947	HKRR	785 aa
CtrA	BMEI0423	RR	

Figure S2

Figure S2. Names attributed to the CDS of the predicted two-component elements from the *Brucella* spp. genomes

The names are indicated with their identification number in the Genbank database (accession no. NC_003317 and NC_003318). The proteins are either predicted as histidine kinase (HK) or response regulator (RR), except for PrlS and CckA, that are predicted as hybrid kinases (HKRR). When applicable, the size (in amino acids) of the C-terminal portion of the protein fused to either AD or BD is indicated.

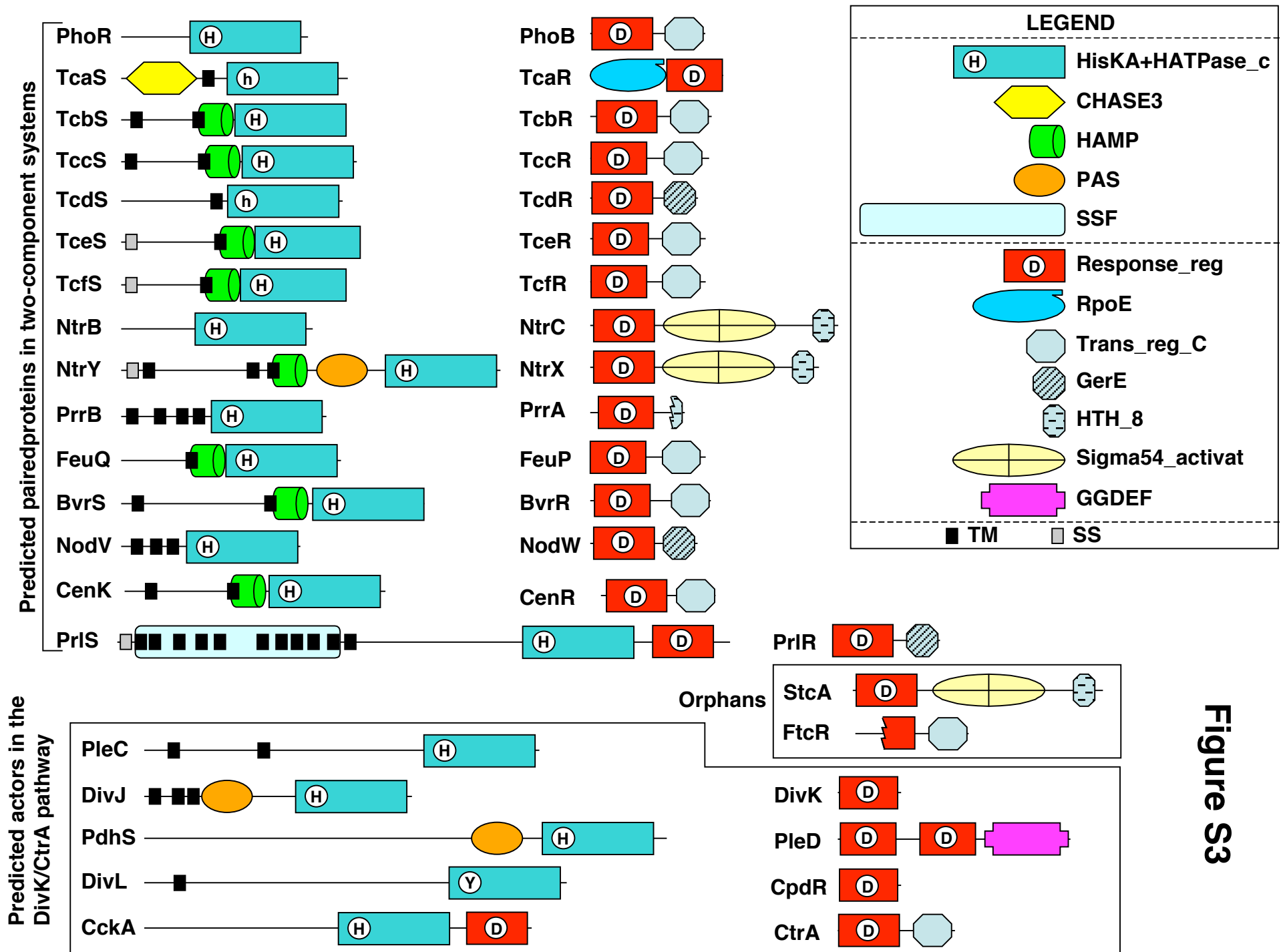


Figure S3. Predicted domains of the two-component proteins in *Brucella* spp.

The domains predicted for each protein are represented on scale. The domain names were extracted from the pfam database. The HisKA and HATPase_c domains were represented as a single box, since they were generally present together at a conserved distance from each other. The TcaS and TcdS sensors share at least one conserved His residue with their homologs, but they do not contain a typical HisKA domain, which is indicated by a “h” instead of “H”. In the DivL protein, the His residue is replaced by a Tyr, as observed in the *C. crescentus* ortholog . The first group of HK and RR represents the paired two-component proteins, which are predicted to interact with each other. The PhoB and PhoR are paired on the basis of Y2H data presented in figure S6, and on the low homologies shared by these two proteins, but their genes are not located in the same genomic locus. The discrimination between transmembrane segments (TM) and signal sequences (SS) is sometimes uneasy, and as a result some predicted N-terminal transmembrane segments may actually be signal sequences. The CHASE3 domain is a predicted periplasmic sensor domain. The SSF domain is predicted to encode an sodium/solute symporter. The incomplete domains are displayed as broken boxes (response_reg domain in FtcR and HTH_8 in PrrA). In FtcR, the Asp57 is not conserved, raising the possibility that this regulator may be insensitive to phosphorylation. All response regulators analysed contain a predicted DNA binding domain (either, Trans_reg_C, GerE or HTH_8) except MdrR, DivK, PleD and TcaR. In the latter case, the RpoE domain is largely divergent from the classical σ^E factors, and the role of this domain in TcaR function remains to be analysed. StcA, MdrR and FtcR are orphan response regulators.

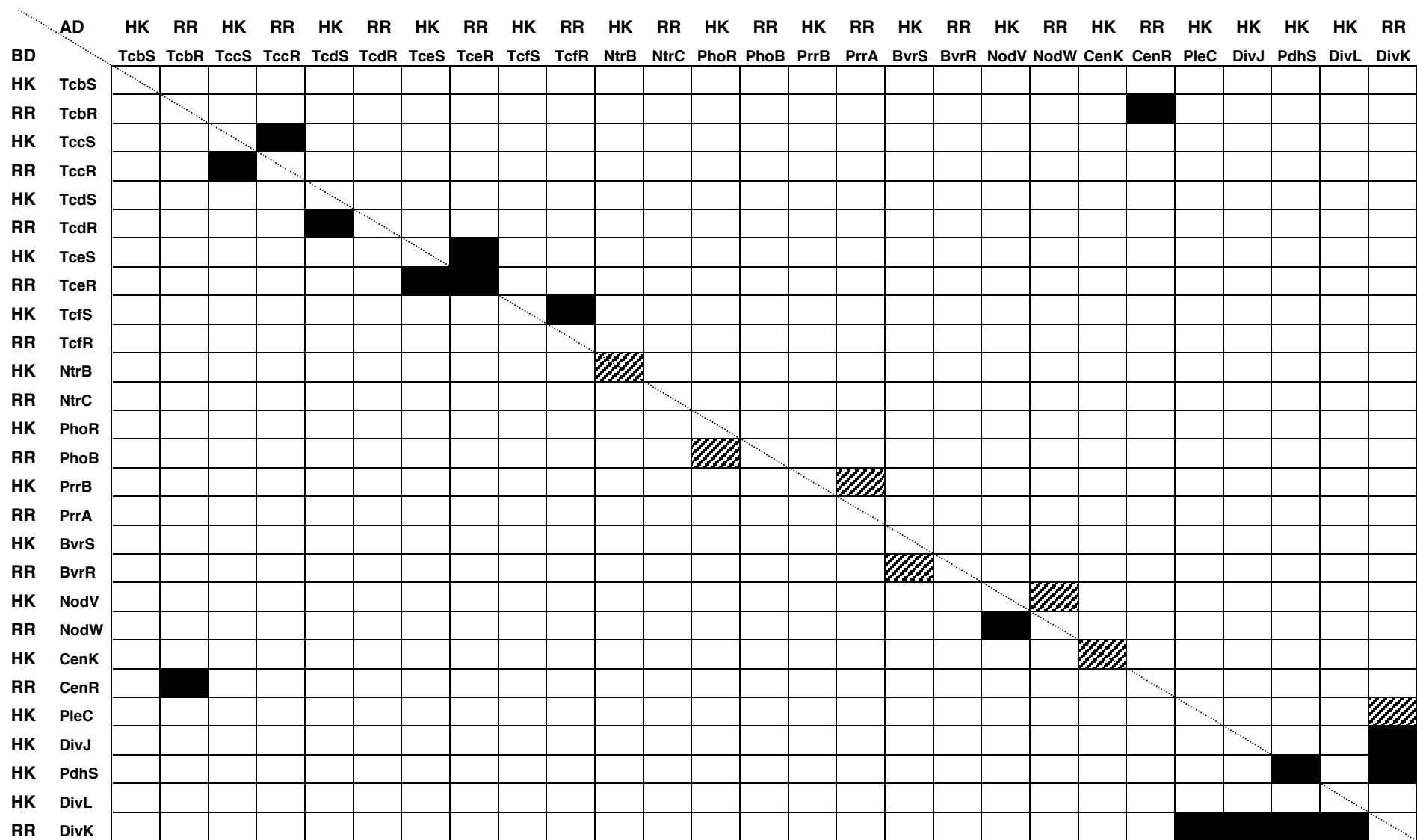


Figure S4

Figure S4. Interaction matrix for the two-component systems predicted in *Brucella* spp.

The BD hybrids are indicated at the beginning of each line, while AD fusions are indicated at the top of the columns. The systems for which no interaction was observed are removed from the list for clarity. The interactions that were detected using both reporters are indicated in black, while interactions identified by the HIS3 reporter only are indicated as hatched rectangles. The “HK” and “RR” labels indicate the predicted functional class of the protein, histidine kinase and response regulator, respectively.

Figure S5

```

CcPleC      MGRHGGPAAAGPTAPSAVRKAVNAPSQVVFVRIAILAALLLVAVYTAFGVHRLQREAMAQ 60
BaPleC      MASTDAYGAPAGTHCESGRKKRK-----GRLSGHVSLLAGPAYSKFIVIEPILRRLVP 53
          * . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

CcPleC      PGGAPLAAKADLIAGRVDANLAAQAGLSAAADLLKRDPGATMDAAETTLRAAGGEAAAV 120
BaPleC      ----TLIIIFLIILG-----VARVFSLLAWRDDIELQHKAALSGATAHL-AQMIERVAN 102
          . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

CcPleC      AVVSEAGVVAVAGRDDGADWKAALAAGASGRTNWVGSVGETGRLYVATTTSLDRARAFV 180
BaPleC      GIETGAQLSAKDLQDAMTELRSRGLTSSG-----MTIAIVDAQSMIK 144
          . : : * : * : * : : : . : : . . . . . . . . . . . . . . . .

CcPleC      IASGDASRLVADPEKGESGALALPDGKLI AARGRGVQGAGALREAFALSIEDLGDPAAV 240
BaPleC      AASGPAG-----IAGSQIDTILGDAQPLFLFAERAGVLRVVL 181
          *** * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

CcPleC      RGQAADGALLDVAVRPVAQGALLAVAAAPTRSVANLDRQVMEGAFSLLVPLGVGIALALL 300
BaPleC      QGEAAFALAKPMTAPYS----IIAVEPESTIFAEWKRAVSLNVTLFAGTIGVMFAILYA 237
          : : * * * . . * : : . . . : . * . * . . : . * * : :

CcPleC      LMIQSRKAEVAHREFIDSERRFRLAVEAARCGIWEWDLNGDQVYLSDVTGAMFGWGGGV 360
BaPleC      YFSQAARAREADDLSGQIQRRIDMALARGCGLWDWDMARGRIYWSRSMYEMLGYESQDA 297
          : * : : * . : : * : : * . * * : : * . . . . . . . . . .

CcPleC      VSGQDLLERISIDHRRVRQALANAAMYGAFDVSRVPASEQGARS LWIDARGQGFGKPG 420
BaPleC      VLPFGDVAAIINEEDGLYSIAEQAAAGDISHVDRVFRMRHADGSWVWMRVR----AEIA 353
          * . : * : . : . : * . . . . . . . . . : * . . : .

CcPleC      SEGhariIGVALDVTEERIAQARAQAAENRLRDAIESVSEAFVLWDRQGRLLMCNRYRS 480
BaPleC      SEGDLHLVGIAFDVSEQHRFAQQTAEDMRIREAIENISEAFVLWDANNRLVMANSKFSE 413
          * * . : : * : * : * : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : .

CcPleC      VFSLEPKILKPGAARAEVNRFAALAIKQDHPAPDGAKG--VREAEMMDGRWIIQISERT 537
BaPleC      YAGLPVWTLKPGVPRNEVDAHTRPFTFERRMANEHNRRAGGQTFERQLSDGRWLQVNERRT 473
          . * . * * . * * : : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * :

CcPleC      AEGGLVMTAADITAIKTQEEARRRNEEQQLONAVAGLERSQE-----QLAELARKYETE 590
BaPleC      QDGGMVSIGTDITQLKLHQLRVDSERRMATVHDL SIARKGERDRVRELSELARKYSLE 533
          : * : * . : * * : * : * . : * . : : : : * : * : * : * . *

CcPleC      KVKAESANKAKSEFLANMSHELRTPLNAINGFSEIMMNMFGPLGDQRYKGSQDIHSSG 650
BaPleC      KERAEEANRAKSEFLANMSHELRTPLNAIIGFSEMIQAGTFGPLGSDRYEEYINDIHTSG 593
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CcPleC      QHLLALINDILDMSKIEAGKMNLKFESMHLEDVAEDAVRLVRNRAEAAGLKLDIDFPQLP 710
BaPleC      NFLLNINDILDMSKIEAGHFLDREEDLCPLINETVRIISLQAEKNIAVETRIEDAM 653
          : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CcPleC      EIEADYRAVKQVLLNLLSNAIKFTPRAGSVTVRVEVRRDPFGDLIKVSVTDTGIGIAKED 770
BaPleC      ELYADRRAIKQVLINLLSNAVKFTSYGG---RITVRARKTGAALFMTIQDTGVGIPKSA 709
          * : * * * : * : * : * : * . * : * * * : : : * : * : * .

CcPleC      LARLAKPFEQVESQFSKTTQGTGLGLALTKSLITMHDGVLEMHSTPGE GTTVSFTLPVRH 830
BaPleC      LRKIGQPFQVENQFTKTHTGSGGLAISRLAELHGGWLRIRSTERVGTVVSVCIPDRN 769
          * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

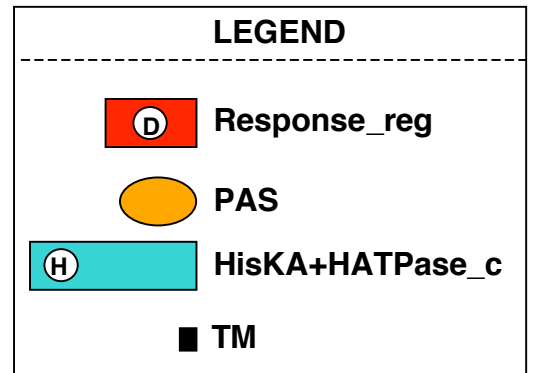
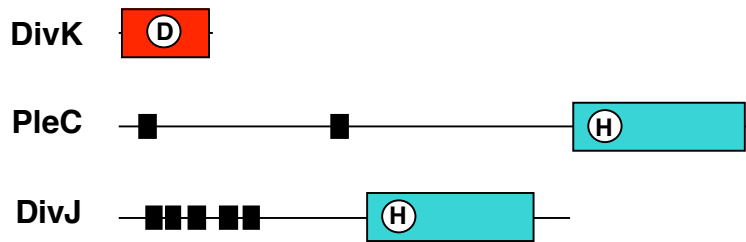
CcPleC      SDQKITRDFVAA-- 842
BaPleC      PAPNAGHDARAHAA 783
          . : : * *

```

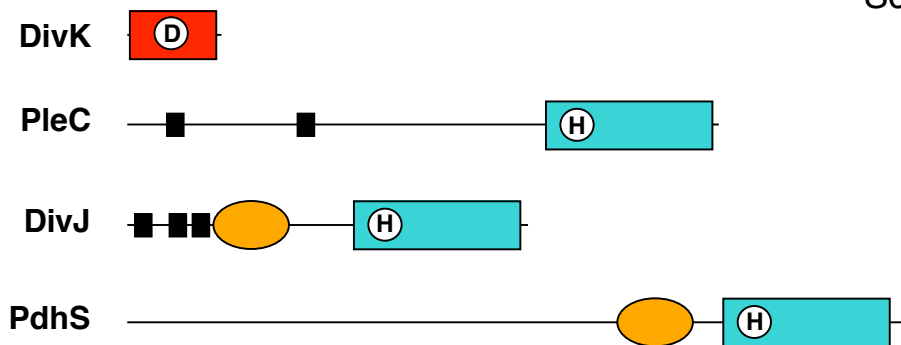
Figure S5. Alignment of *B. abortus* PleC with *C. crescentus* PleC. The H residue highlighted in red is the conserved phosphorylated histidine.

Figure S6

Caulobacter crescentus



Brucella abortus



Scale : 100 aa

Figure S6. Domain's composition of *C. crescentus* DivK, PleC and DivJ, and *B. abortus* DivK, PleC, DivJ and PdhS. TM are transmembrane segments. Domain's names are from the Pfam database.

Figure S7

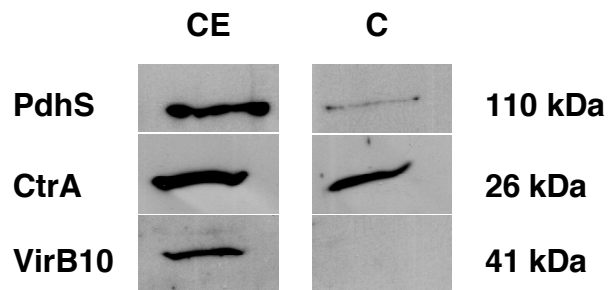
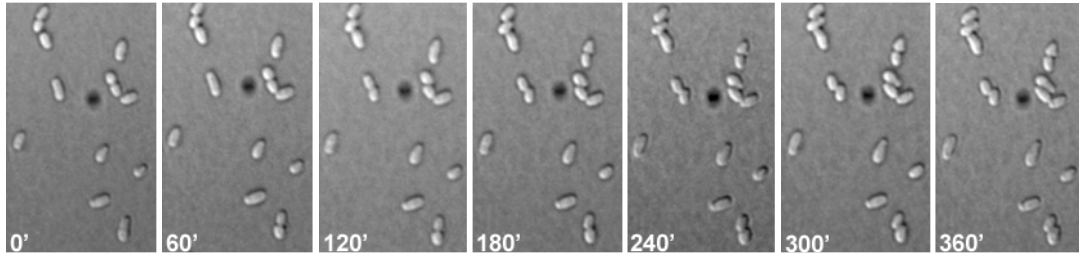


Figure S7. PdhS is a cytoplasmic histidine kinase

Western blot analysis of relative PdhS protein levels performed on cellular fractionation of a mid-exponential wild-type culture. The CtrA and VirB10 proteins were respectively used as positive and negative controls for the cytoplasmic fraction. CE and C indicate crude extract and cytoplasmic fraction, respectively. The predicted size of each *B. abortus* protein is indicated on the right of immunoblots.

Figure S8

A.



B.

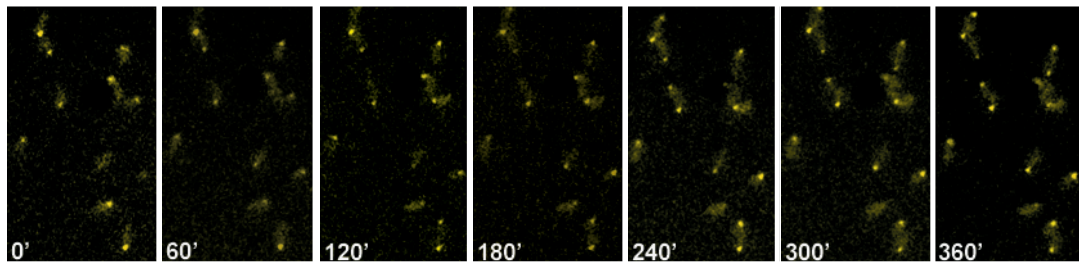
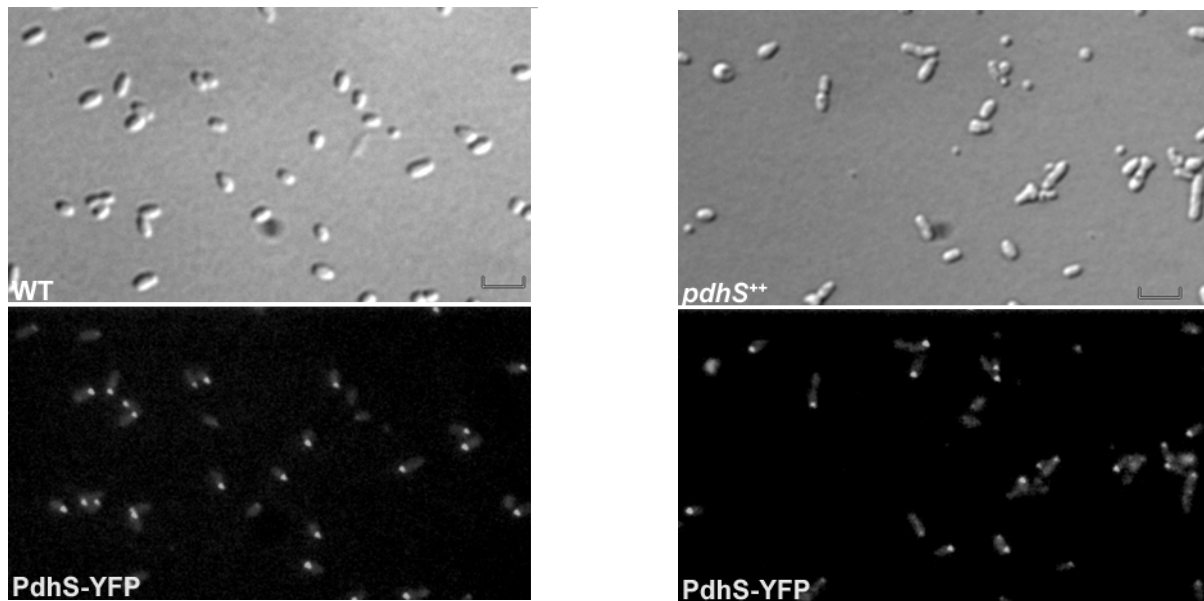


Figure S8. PdhS is dynamically localized at one pole of *B. abortus*

PdhS dynamically localizes at the old pole of *B. abortus* cells. A timelapse microscopy experiment was performed on the XDB1104 strain expressing *pdhS-yfp* by taking DIC (A) and corresponding fluorescence (B) images each 60 minutes.

Figure S9

A.



B.

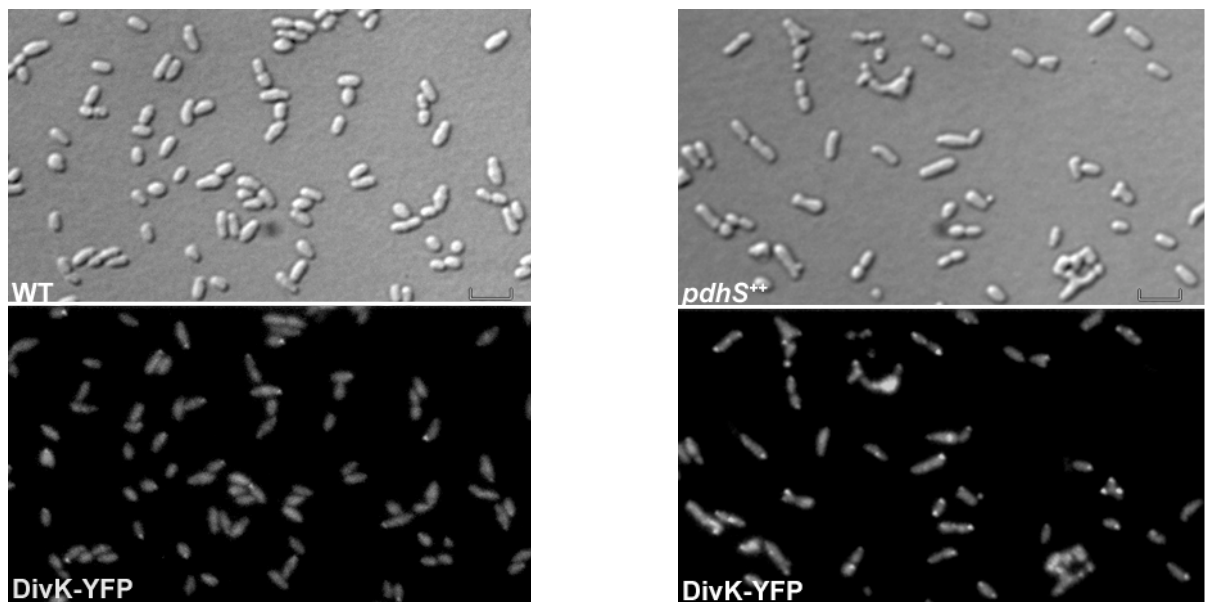


Figure S9. The overexpression of *pdhS* leads to the accumulation of DivK-YFP at pole(s)
 (A) PdhS-YFP remains polarly localized in *B. abortus* cells overexpressing *pdhS*. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* cells producing PdhS-YFP (strain XDB1104) in the presence of pBBR1-MCS1 (left) or pRH232 (right).
 (B) DivK-YFP accumulated at poles in *B. abortus* cells overexpressing *pdhS*. DIC and corresponding fluorescence images were taken of *B. abortus* cells producing DivK-YFP (strain XDB1106) in the presence of pBBR1-MCS1 (left) or pRH232 (right).

DISCUSSION GENERALE

Les travaux qui ont été réalisés au cours de cette thèse ont permis de découvrir d'une part que *Brucella abortus* se divise de manière asymétrique en générant deux cellules morphologiquement et phénotypiquement différentes, et d'autre part qu'une de ces deux cellules filles subit un événement de différenciation. En effet, l'achèvement de la division bactérienne chez *B. abortus* donne naissance à deux cellules filles de taille différente, une grande cellule au sein de laquelle PdhS est localisé au vieux pôle, et une plus petite dépourvue de toute localisation polaire de PdhS. Deux niveaux de différenciation chez *B. abortus* ont pu être observés grâce au suivi de la localisation de PdhS au cours du temps. La première se déroule au sein de la cellule prédivisionnelle, puisque les deux compartiments cellulaires qui donneront naissance aux deux types cellulaires sont inégaux au regard de la localisation polaire de PdhS. En effet, PdhS présente une localisation polaire que dans le compartiment correspondant à la grande cellule. Cette dichotomie de localisation est conservée après la séparation des cellules filles. Le second type de différenciation s'opère après la division puisqu'elle représente la différenciation du stade petite cellule au stade grande cellule, qui coïncide avec la capacité qu'a cette grande cellule à acquérir PdhS à son vieux pôle. Par analogie, les deux niveaux de différenciation chez *B. abortus* peuvent être comparés à ceux que suivent *C. crescentus*. En effet, la division asymétrique donnant naissance à deux cellules filles morphologiquement et phénotypiquement différentes existe chez cette espèce puisque l'achèvement de la division bactérienne donne naissance à une petite cellule flagellée et une grande cellule pédonculée. Une des différences majeures entre l'asymétrie de ces deux espèces réside dans le fait que chacune des cellules filles de *C. crescentus* possède un appendice polaire différent, un flagelle ou un pédoncule, ce qui facilite l'attribution de fonctions spécifiques pour chacune des cellules filles et de ce fait atteste l'asymétrie fonctionnelle chez cette espèce. *B. abortus* ne possède pas de pédoncule et exprime un appendice flagellaire dans une petite proportion de la population mais qui ne semble pas être impliqué dans la mobilité (Fretin et al., 2005). Cette absence de fonctions polaires facilement observables, telles que la mobilité ou l'attachement, explique probablement la raison pour laquelle l'asymétrie de *B. abortus* n'ait jamais été décrit auparavant. Il serait donc intéressant d'attribuer des fonctions spécifiques aux pôles de chacun des deux types cellulaires de *B. abortus*. Plusieurs approches sont envisageables. Nous pourrions par exemple rechercher les protéines qui se localisent spécifiquement à chacun de ces pôles. De cette manière, nous pourrions nous servir des fonctions attribuées à ces protéines polaires pour éclaircir le rôle spécifique de chacune des cellules filles. Ce travail a été initié dans le laboratoire (Dotreppe et De Bolle, données non publiées). Une autre approche consisterait à synchroniser une population de *B. abortus* d'une manière similaire à ce qui se fait pour *C. crescentus*. De cette façon, nous pourrions utiliser la population synchronisée pour infecter des monocouches de cellules phagocytaires et déterminer si l'un ou l'autre type cellulaire assure un rôle au cours des premières phases d'infection. Rappelons que durant les premières heures d'infection, *B. abortus* dévie le trafic intracellulaire de la cellule hôte sans se diviser. Les bactéries intracellulaires commenceront à se répliquer activement lorsqu'elles auront atteint leur niche de réplication. Il est donc concevable que ces deux phases d'infection puissent être assurées par chacun des types cellulaires. Les petites cellules pourraient par exemple être capables de dévier le trafic, et se différencier en grandes cellules une fois le trafic dévié. Ces grandes cellules pourraient alors se répliquer. Cette hypothèse prédit que les petites cellules doivent se différencier en grandes cellules pour initier un cycle de réplication. Par analogie, c'est exactement ce qu'il se passe chez *C. crescentus* puisque les petites cellules flagellées ne sont pas compétentes pour la réplication d'ADN et doivent impérativement se différencier en

cellules pédonculées pour initier un nouveau cycle cellulaire. La division asymétrique observée chez *B. abortus*, et probablement la différenciation qui en découle, pourraient bien avoir été conservées au cours de l'évolution au sein du groupe extrêmement diversifié que représente les α -protéobactéries. En effet, au moins 4 espèces d' α -protéobactéries se divisent asymétriquement. En outre, PdhS présente la particularité d'être localisé asymétriquement chez deux autres α -protéobactéries, *S. meliloti* and *C. crescentus*.

Les fonctions assurées par PdhS ne sont pas encore élucidées. On soupçonne que cette HK contrôle l'état de phosphorylation de DivK puisque ces deux protéines interagissent physiquement et co-localisent à un pôle de *B. abortus*. De plus, PdhS semblent contrôler l'abondance de CtrA chez *B. abortus*, ce qui appuie l'idée que cette HK fait partie de la voie dépendante de DivK qui contrôle l'activité de CtrA. Il serait donc intéressant de déterminer si PdhS joue un rôle préférentiel de kinase ou de phosphatase vis-à-vis de DivK. De même un mutant conditionnel pourrait nous renseigner sur l'impact qu'a PdhS sur la localisation de DivK et sur l'abondance de CtrA. Enfin d'une manière plus globale, la recherche d'autres partenaires physiques de PdhS et de DivK nous renseignerait sur les fonctions spécifiques assurées par ces deux acteurs. Ces approches ont été initiées dans le laboratoire (Mignolet et De Bolle, données non publiées).

L'analyse du régulon de CtrA chez différentes espèces d' α -protéobactéries a permis d'émettre plusieurs idées. La recherche d'acteurs potentiellement impliqués dans le contrôle de ce RR supporte l'hypothèse que les voies en amont de CtrA sont particulièrement bien conservées (Bellefontaine et al., 2002; Hallez et al., 2004). En effet, chacun des RR et HK impliqués dans le contrôle de CtrA présente un orthologue chez plusieurs espèces d' α -protéobactéries, avec parfois la présence d'un paralogue supplémentaire. A titre d'exemple, citons DivJ et PleC qui font partie de la même sous-famille d'HK puisqu'elles partagent 46% d'identité protéique. Alors que les HK de cette sous-famille sont au nombre de 2 chez *C. crescentus*, il existe respectivement 3 et 4 représentants de cette sous-famille chez *B. abortus* et *S. meliloti* (Hallez et al., 2004). Ces différentes HK pourraient servir à sentir plusieurs stimuli présents dans les différents environnements que rencontrent ces espèces (vie extracellulaire *versus* infection cellulaire pour *B. abortus* par exemple). Le fait que les parties les moins bien conservées entre ces différentes HK se situent au niveau de leur domaine senseur supporte cette hypothèse. L'identification de gènes cibles potentiellement régulés par CtrA sur base des éléments *cis* liés par ce RR a permis de proposer que le régulon de CtrA est particulièrement bien conservé chez différentes espèces d' α -protéobactéries. En effet, dans bon nombre de cas, CtrA contrôle les mêmes processus cellulaires et ce en n'ayant pas forcément les mêmes gènes cibles (Bellefontaine et al., 2002; Hallez et al., 2004). Par exemple, CtrA contrôle la méthylation de l'ADN en régulant l'expression d'un seul et même gène, *ccrM*. Par contre, CtrA contrôle la division bactérienne en régulant l'expression de gènes différents, à savoir *ftsZ* chez *C. crescentus* et l'opéron *minCDE* chez *B. abortus*, *S. meliloti* ou encore *A. tumefaciens*. Ces observations suggèrent que le cœur du régulon de CtrA (reprenant les voies de régulation de CtrA et les processus cellulaires placés sous le contrôle de CtrA) a été conservé au cours de l'évolution, alors que les « input » (définis par les domaines senseurs des HK) et les « output » (définis par la distribution des séquences *cis* reconnus par CtrA) ont divergé probablement en fonction des styles de vie de chacune des α -protéobactéries.

En conclusion, bien que les α -protéobactéries présentent de nombreuses différences morphologiques, génétiques et comportementales, il semblerait que l'asymétrie et la différenciation, probablement contrôlées par le régulon de CtrA, constituent deux caractères phénotypiques transmis depuis l'ancêtre commun à de nombreuses, si pas toutes les espèces d' α -protéobactéries.

ANNEXES

I. « Gateway-based destination vectors for functional analyses of bacterial ORFeomes: application to the Min system in Brucella abortus »

Cet article a été publié dans la revue « Applied and Environmental Microbiology ».

Présentation du travail

La construction ainsi que la validation de 20 vecteurs plasmidiques compatibles avec la technologie de clonage GatewayTM sont décrites dans cet article. La validation des vecteurs exprimant des fusions traductionnelles avec des protéines fluorescentes nous ont en outre permis d'observer que la protéine MinD, impliquée dans le contrôle du positionnement de l'anneau Z, oscille entre les pôles de *B. abortus*, comme c'est le cas chez *E. coli*.

Contribution des auteurs

Toutes les données présentées dans l'article ont été obtenues par R.H., La rédaction de l'article a été réalisée par R.H. et X.D B. L'ensemble du travail a été supervisé par X.D B, J-J.L. et J.V.

Gateway-Based Destination Vectors for Functional Analyses of Bacterial ORFeomes: Application to the Min System in *Brucella abortus*^{∇†}

Régis Hallel,[‡] Jean-Jacques Letesson, Jean Vandenhoute, and Xavier De Bolle*

Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

Received 7 August 2006/Accepted 4 December 2006

Twenty Gateway-compatible destination vectors were constructed. The vectors comprise fluorescent and epitope fusion tags, various drug markers, and replication origins that should make them useful for exploring existing microbial ORFeomes. In an attempt to validate several of these vectors, we observed polar and oscillating localization of MinD in *Brucella abortus*.

ORFeomes are comprehensive collections of predicted coding sequences or open reading frames (ORFs) of a given organism (3). The availability of complete bacterial ORFeomes such as those described for *Brucella melitensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Sinorhizobium meliloti* (6, 14, 18) (other bacterial ORFeomes are available at the TIGR resources: <http://pfgrc.tigr.org/>) require plasmidic tools to study biological functions of ORFs at proteomic levels, such as interactomes and localizomes (13, 15). Since the constructions of ORFeomes cited above were based on the site-specific integration/excision reactions used by bacteriophage λ and called “Gateway recombinational cloning” (8, 23), we designed three sets of Gateway-compatible destination vectors useful for functional analyses of these bacterial ORFeomes.

The first set was designed for complementation of loss-of-function mutants and for constitutive overexpression of ORFs. The second set allows translational fusion with fluorescent proteins (cyan fluorescent protein [CFP], yellow fluorescent protein [YFP], and enhanced green fluorescent protein [EGFP]) for determining subcellular localization and colocalization of proteins. The last set of vectors provide translational fusions to tag coding sequences (21, 22), therefore making them useful for in vivo coexpression of ORFs and/or coimmunoprecipitation experiments. Integrative versions of these plasmids were also constructed to allow expression of a tagged ORF under the control of its native promoter. A detailed description of plasmid constructions is provided in the supplemental material. All plasmids reported here are available from the Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMBP plasmid collection) (<http://bccm.belspo.be/about/lmbp.php>).

Expression vectors. Vectors described in this section were designed for functional complementation assays or constitutive overexpression of bacterial ORFs. Destination vectors pRH001, pRH002, and pRH003 were obtained by cloning the Gateway cassette reading frame B into pMR10cat, pBBR1-MCS1, and pBBR1-MCS4, respectively (Table 1). The orientation of the Gateway cassette in these three destination vectors was selected to ensure that ORFs were placed under the control of the *Escherichia coli lac* promoter after *attL-attR* (LR) reactions. pRH001 (previously named pMR10cat Gateway) was validated in previous work using complementation assays (5, 7). The transcriptional regulators ArsR6 and GntR4 were identified to control the expression of the *virB* operon since no VirB proteins could be detected in the corresponding Δ arsR6 and Δ gntR4 mutants (7). Expression of *arsR6* and *gntR4* from pRH001-*arsR6* and pRH001-*gntR4* completely restored the wild-type level of production of VirB9, one of the 11 proteins encoded by the *virB* operon (7). pRH001-*rsh* was also used to perform a heterospecific complementation of an *S. meliloti relA* mutant with the orthologous *B. melitensis rsh* (5). From these data we can conclude that pRH001 is functional for performing complementation of loss-of-function mutants, at least in bacterial species in which the *E. coli lac* promoter is functional.

We used the Y-shape phenotype displayed by *Brucella* overexpressing the response regulator CtrA (2) to test the functionality of pRH002 and pRH003 for overexpressing ORFs. As expected, *B. abortus* wild-type strain cells expressing *ctrA* from pRH002-*ctrA* and pRH003-*ctrA* are branched and larger than the wild-type control (Fig. 1A and B and data not shown), as previously described (2). The level of expression of CtrA from these two plasmids in *B. abortus* was also compared to the wild-type CtrA level by Western blotting (Fig. 1C and data not shown). From these experiments we can conclude that pRH002 and pRH003 can be used to overexpress ORFs.

Fluorescence vectors. An increasing number of bacterial proteins have been reported in the past decade to be localized at discrete locations in bacteria (10, 11, 19). In order to determine the subcellular localization of bacterial proteins by direct fluorescence microscopy, we designed the second set of destination vectors (Table 1). These destination vectors allow the expression of fusions of ORF-encoded proteins to the N termini of fluorescent proteins. All fluorescence destination vectors





















* Corresponding author. Mailing address: Unité de Recherche en Biologie Moléculaire, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium. Phone: 32 81 72 44 38. Fax: 32 81 72 42 97. E-mail: xavier.debolle@fundp.ac.be.

† Supplemental material for this article may be found at <http://asm.asm.org/>.

‡ Present address: Laboratoire de Génétique des Procaryotes, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Université Libre de Bruxelles, 12 Rue des Professeurs Jeener et Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium.

[∇] Published ahead of print on 15 December 2006.

TABLE 1. Destination vectors described in this study

Vector	Insert ^a	Antibiotic marker(s) ^b	Replication origin ^c
Expression			
pRH001		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH002		Cm ^r	pBBR1
pRH003		Amp ^r	pBBR1
Fluorescence			
pRH004		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH005		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH006		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH007		Amp ^r	ColE1
pRH008		Amp ^r	ColE1
pRH009		Amp ^r	ColE1
pRH010		Amp ^r , Kan ^r	ColE1
pRH011		Amp ^r , Kan ^r	ColE1
pRH012		Amp ^r , Kan ^r	ColE1
Tagging			
pRH013		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH014		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH015		Kan ^r , Cm ^r	RK2oriV
pRH016		Cm ^r	pBBR1
pRH017		Cm ^r	pBBR1
pRH018		Cm ^r	pBBR1
pRH019		Cm ^r	ColE1
pRH020		Cm ^r	ColE1

^a Arrows illustrate the *E. coli lac* promoter. "Cassette" means a Gateway cassette comprising *attR1*, *cat*, *ccdB*, and *attR2*.

^b Kan^r, Cm^r, and Amp^r are antibiotic markers which confer resistance to kanamycin, chloramphenicol, and ampicillin, respectively.

^c RK2oriV (C. D. Mohr and R. C. Roberts, unpublished), pBBR1 (1, 12), and ColE1 are, respectively, the replication origins of pMR10cat, pBBR1-MCS1, and pBluescript II SK(-) (Stratagene).

described in this section are derived from pMR10cat, and the Gateway cassette in frame with *cfp*, *yfp*, or *egfp* was placed in the same orientation as the *E. coli lac* promoter.

Selection of the proper division site at midcell in bacteria such as *E. coli* requires the specific inhibition of septation at poles. This is mediated by the coordinated action of MinC, MinD, and MinE proteins. The division inhibition complex MinC/MinD, restricted to cell poles through the action of the topological specificity factor MinE, avoids the formation of a polar Z ring (4). In this system, MinD supplies polar localiza-

tion (16, 17). We therefore tested if *minD*_{Bm} (BMEII0926 in the *B. melitensis* genome; AAL54168 in GenBank) encodes a protein localized at a pole(s) in *B. abortus*. To this end, we transferred *minD*_{Bm} from the pDONR201-*minD* entry clone available in the *Brucella* ORFeome (6) into pRH004, pRH005, and pRH006. The products of the LR reactions, performed as recommended by the manufacturer (Invitrogen), were electroporated into *E. coli* DH10B and selected on Luria-Bertani plates supplemented with chloramphenicol (20 µg/ml). Plasmids pRH004, pRH005, and pRH006, expressing *minD*_{Bm}, were then

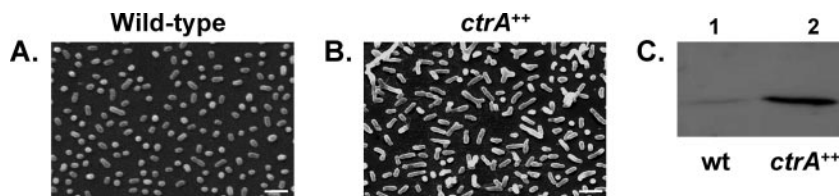


FIG. 1. Overexpression of *ctrA* in *Brucella abortus* leads to large Y-shaped bacteria. Shown are scanning electron micrographs of the *B. abortus* 544 wild-type strain (A) and a strain overexpressing *ctrA* from pRH002 (B). The scale bar represents 2 μ m. (C) The overproduction of CtrA in a strain containing pRH002 (lane 2) was monitored by Western blotting using anti-CtrA antibodies, as previously described (2), with the wild-type (wt) strain as a control (lane 1). The same amount of proteins was loaded in each well.

transferred by conjugation into *B. abortus* 544. The mid-exponential-phase cultures of three independent clones expressing *minD_{Bm}* on pRH004, pRH005, and pRH006 were embedded in a 1% agarose pad on microscope slides as previously described (9). Differential interference contrast (DIC) and fluorescence images were then acquired using Nikon E1000 microscope with the corresponding filter cubes.

As illustrated in Fig. 2A, *B. abortus* producing MinD_{Bm}-CFP, MinD_{Bm}-YFP, or MinD_{Bm}-EGFP showed fluorescent signals in the form of an arc following the line of the pole or polar focus (Fig. 2A, arrows) at either one or both poles in more than 90% of the bacteria examined. This is consistent with the localization of MinD described for other bacterial species such as *E. coli* (17) or *Bacillus subtilis* (16). Moreover, images taken at 30-second intervals of the same field indicated that MinD_{Bm} in *B. abortus* is polarly localized in a dynamic fashion by oscillating from one pole to the opposite pole, as was described for *E. coli* but not for *B. subtilis* (Fig. 2B).

Similar observations were made when MinD_{Bm} was localized in the *B. melitensis* 16 M wild-type strain (data not shown).

We could observe in some bacterial cells a helical pattern of MinD_{Bm} localization (data not shown), which has already been described for *E. coli* (20). Finally, in most cells at a late stage in the cell division process, a discrete fluorescence signal at the center of dividing cells was observed (Fig. 2A, arrowheads). This suggests that MinD_{Bm} does not localize dynamically only at old poles, probably to inhibit formation of mislocalized Z ring (i.e., polar Z ring), but also at division sites before completion of cell constriction, probably to prevent another division from taking place near the newly formed poles. It was previously found that MinD is targeted to old and newly formed poles in *B. subtilis* (16).

These results demonstrated that (i) pRH004, pRH005, and pRH006 can be used for determining the subcellular localization of bacterial proteins and that (ii) MinD_{Bm} is polarly localized and oscillates from one pole to the other in *B. abortus*, as previously shown for *E. coli*.

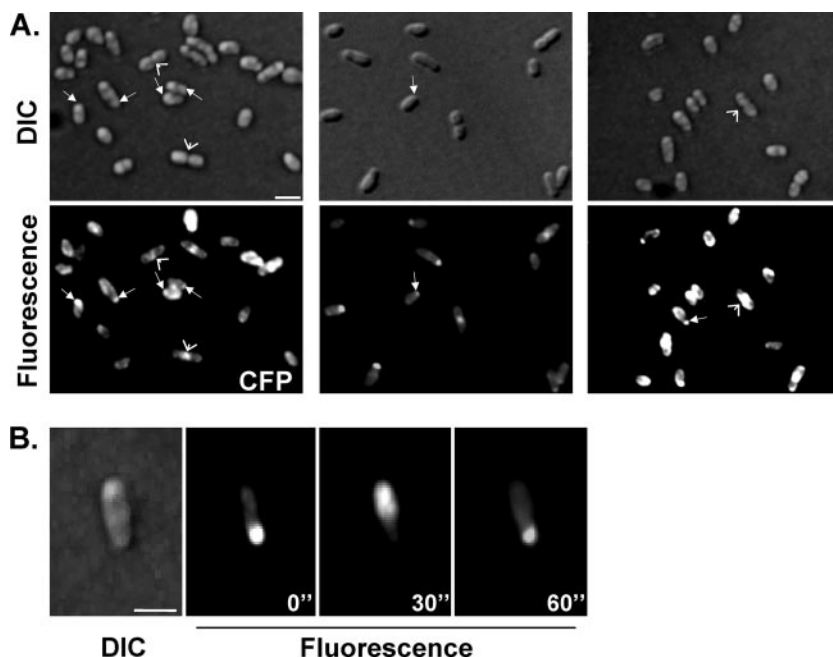


FIG. 2. MinD is dynamically localized at the cellular pole(s) in *B. abortus*. (A) *B. abortus* 544 wild-type strains expressing *minD_{Bm}* fused in frame with *cfp*, *yfp*, and *egfp* from pRH004, pRH005, and pRH006, respectively, were cultivated in rich liquid medium until mid-exponential phase before samples were prepared for examination under a fluorescence microscope as previously described by Jacobs et al. (9). DIC and corresponding fluorescent images are presented. White arrows indicate polar localization of MinD_{Bm}, while arrowheads show midcell localization. (B) Representative time-lapse fluorescence microscopy experiment on a *B. abortus* 544 cell containing pRH005 plasmid-encoded MinD_{Bm}-YFP. DIC and fluorescent images were taken every 30 seconds. Scale bar, 1 μ m.

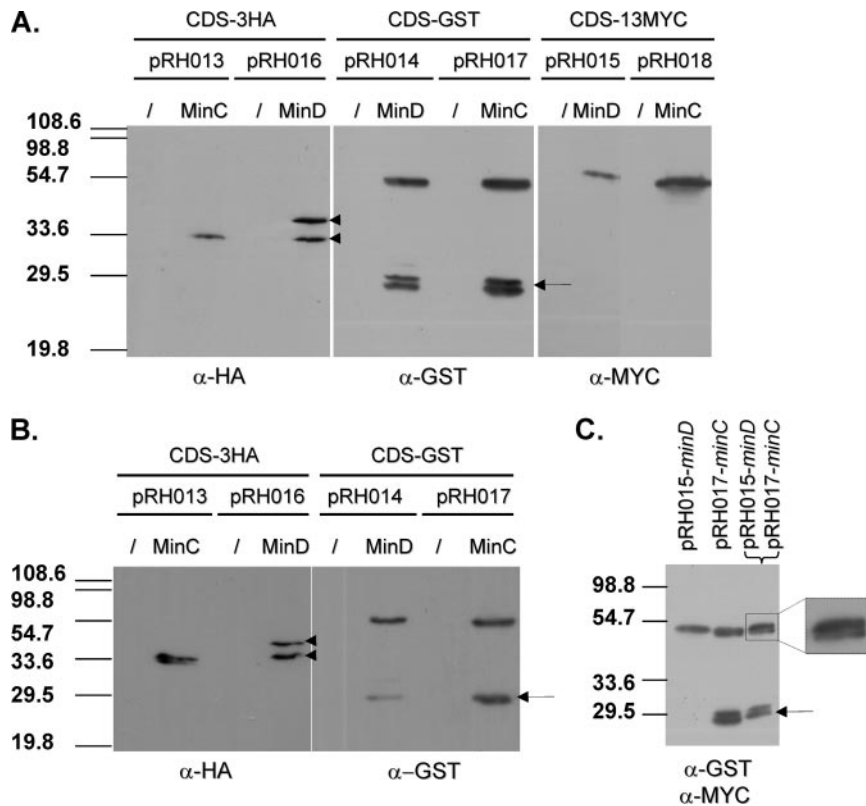


FIG. 3. Expression and coexpression of *Brucella* MinC and MinD fused to tags (3HA, GST, and 13MYC) in *E. coli* and *B. abortus*. Western blot experiments were carried out on *E. coli* DH10B (A and C) and *B. abortus* 544 (B) crude extracts with anti-HA (α -HA) (Eurogentec), anti-GST (Sigma), and anti-MYC (Eurogentec) sera at a dilution of 1/1,000. Arrows indicate GST protein translated from its own ATG. The Gateway cassette in frame with 3HA cloned into pRH016 is in the same frame as the *lacZ'* present in the pBBR1-MCS1 backbone, therefore allowing translation of a hybrid protein such as MinD-3HA from two different ATGs, which gave rise to two protein products of different sizes (indicated by arrowheads). The shills represent the corresponding parental empty plasmid, the RK2oriV-based low-copy-number plasmid pMR10cat for pRH013 to pRH015, and pBBR1-MCS1 for pRH016 to pRH018. For the coexpression experiment (C), the anti-GST serum was first used, directly followed by incubation with the anti-MYC serum.

Tagging vectors. Studying biological functions of a gene product requires understanding the complex network(s) in which it is directly implicated. In this context, mapping physical protein-protein interactions is an important step. Yeast two-hybrid vectors are already available in a Gateway-compatible format (15), and here we describe vectors allowing protein tagging, and therefore high-throughput coimmunoprecipitation or pull-down tests. The first six tagging destination vectors are derived from pMR10cat (pRH013 to pRH015) and pBBR1-MCS1 (pRH016 to pRH018). These vectors allow expression of protein-coding ORFs in frame with three repetitions of a hemagglutinin (HA) epitope (3HA in pRH013 and pRH016), glutathione *S*-transferase (GST in pRH014 and pRH017), or 13 repetitions of the MYC epitope (13MYC in pRH015 and pRH018) under the control of the *E. coli* *lac* promoter. We assayed the tagging destination vectors (pRH013 to pRH018; Table 1) by using *minD*_{Bm} or *minC*_{Bm} (genomic and GenBank accession numbers BMEII0927 and AAL54169, respectively) and performing Western blot experiments on *E. coli* DH10B and *B. abortus* 544 crude extracts with anti-HA, anti-GST, or anti-MYC antibodies. As shown in Fig. 3A and B, hybrid proteins MinD_{Bm} and MinC_{Bm} fused to 3HA, GST, or 13MYC were detected at the expected sizes in crude extracts

from *E. coli* (Fig. 3A) and *B. abortus* (Fig. 3B and data not shown). Neither MinD_{Bm} nor MinC_{Bm} cross-reacted with anti-HA, anti-GST, or anti-MYC antibodies since we did not detect any protein bands on crude extracts from *E. coli* and *B. abortus* strains expressing *minD*_{Bm} or *minC*_{Bm} from pRH001 or pRH002 (data not shown).

Moreover, we were also able to detect two different hybrid proteins (i.e., MinC_{Bm}-GST and MinD_{Bm}-13MYC) in a crude extract prepared from *E. coli* DH10B carrying two compatible clones, pRH017-*minC*_{Bm}-GST and pRH015-*minC*_{Bm}-13MYC (Fig. 3C). Similar experiments were performed with *E. coli* cells coproducing MinC_{Bm}-3HA from pRH013 and MinC_{Bm}-GST from pRH017 (data not shown).

These results validated the use of pRH013 to pRH018 for expression or coexpression of tagged protein-coding ORFs, which will be useful for detecting physical interaction by coaffinity or coimmunoprecipitation of protein complexes.

Integrative reporter vectors. The last group of destination vectors described here, pRH007 to pRH012, pRH019, and pRH020 (Table 1), are made for monitoring gene expression. Indeed, they are designed to fuse an ORF to the coding sequence (CDS) for a fluorescent protein (CFP, YFP, or EGFP) or to the CDS for a tag (3HA, GST or 13MYC) but differ from

vectors described in previous sections (pRH004 to pRH006 and pRH013 to pRH018) by the absence of a promoter region. Since these vectors are replicative only in members of the *Enterobacteriaceae* family, they are expected, in all other bacteria, to integrate into the genome at the locus where the ORF is located by homologous recombination, therefore duplicating the target ORF. This would result in the fusion between endogenous promoter, CDS, and the fused tag, allowing the monitoring of gene expression through fluorescence or quantification of tag abundance. pRH007 to pRH012 destination vectors may also be used to determine the localization of the corresponding proteins expressed from the endogenous promoter since after LR reactions ORFs are in frame with the fluorescent reporter genes. In this way, vectors pRH010 to pRH012 were successfully used for determining the subcellular distribution of several proteins involved in cell division and differentiation of *B. abortus* (R. Hallez, unpublished results).

In conclusion, we designed 20 Gateway destination vectors divided into three groups for functional analyses of complete or partial bacterial ORFeomes. These vectors open the way to genome-wide investigations such as localizome, i.e., the subcellular localization of all predicted proteins of a given bacterium.

We are very grateful to A. Dricot, J. Mignolet, and R.-M. Genicot for generous technical assistance during cloning procedures. We thank M. Vidal, D. Hill, and J.-F. Rual for helpful and stimulating discussions and L. Van Melder and B. Nkengfac for comments on the manuscript. We also thank the "Unité Interfacultaire de Microscopie Electronique" of the University of Namur for providing a scanning electron microscopy facility.

This work was supported by Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (convention 2.4521.04) and by an "Action de Recherche Concertée" (ARC 04/09-325, Communauté Française de Belgique). At the time of this study, Régis Hallez held a Ph.D. fellowship from the Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture.

REFERENCES

1. Antoine, R., and C. Locht. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* **6**:1785–1799.
2. Bellefontaine, A. F., C. E. Pierreux, P. Mertens, J. Vandenhaute, J. J. Letesson, and X. De Bolle. 2002. Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol. Microbiol.* **43**:945–960.
3. Brasch, M. A., J. L. Hartley, and M. Vidal. 2004. ORFeome cloning and systems biology: standardized mass production of the parts from the parts-list. *Genome Res.* **14**:2001–2009.
4. de Boer, P. A., R. E. Crossley, and L. I. Rothfield. 1989. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**:641–649.
5. Dozot, M., R. A. Boegegrain, R. M. Delrue, R. Hallez, S. Ouahrani-Bettache, I. Danese, J. J. Letesson, X. De Bolle, and S. Kohler. 2006. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell. Microbiol.* **8**:1791–1802.
6. Dricot, A., J. F. Rual, P. Lamesch, N. Bertin, D. Dupuy, T. Hao, C. Lambert, R. Hallez, J. M. Delroisse, J. Vandenhaute, I. Lopez-Goni, I. Moriyon, J. M. Garcia-Lobo, F. J. Sangari, A. P. Macmillan, S. J. Cutler, A. M. Whatmore, S. Bozak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M. Vidal, D. E. Hill, J. J. Letesson, and X. De Bolle. 2004. Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res.* **14**:2201–2206.
7. Haine, V., A. Sinon, F. Van Steen, S. Rousseau, M. Dozot, P. Lestrade, C. Lambert, J. J. Letesson, and X. De Bolle. 2005. Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M reveals a major role for GntR regulators in the control of virulence. *Infect. Immun.* **73**:5578–5586.
8. Hartley, J. L., G. F. Temple, and M. A. Brasch. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**:1788–1795.
9. Jacobs, C., I. J. Domian, J. R. Maddock, and L. Shapiro. 1999. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**:111–120.
10. Jacobs-Wagner, C. 2004. Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol. Microbiol.* **51**:7–13.
11. Jensen, R. B., and L. Shapiro. 2000. Proteins on the move: dynamic protein localization in prokaryotes. *Trends Cell Biol.* **10**:483–488.
12. Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
13. Kumar, A., S. Agarwal, J. A. Heyman, S. Matson, M. Heidtman, S. Piccirillo, L. Umansky, A. Drawid, R. Jansen, Y. Liu, K. H. Cheung, P. Miller, M. Gerstein, G. S. Roeder, and M. Snyder. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* **16**:707–719.
14. Labaer, J., Q. Qiu, A. Anumanthan, W. Mar, D. Zuo, T. V. Murthy, H. Taycher, A. Halleck, E. Hainsworth, S. Lory, and L. Brizuela. 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. *Genome Res.* **14**:2190–2200.
15. Li, S., C. M. Armstrong, N. Bertin, H. Ge, S. Milstein, M. Boxem, P. O. Vidalain, J. D. Han, A. Chesneau, T. Hao, D. S. Goldberg, N. Li, M. Martinez, J. F. Rual, P. Lamesch, L. Xu, M. Tewari, S. L. Wong, L. V. Zhang, G. F. Berriz, L. Jacotot, P. Vaglio, J. Reboul, T. Hirozane-Kishikawa, Q. Li, H. W. Gabel, A. Elewa, B. Baumgartner, D. J. Rose, H. Yu, S. Bosak, R. Sequerra, A. Fraser, S. E. Mango, W. M. Saxton, S. Strome, S. Van Den Heuvel, F. Piano, J. Vandenhaute, C. Sardet, M. Gerstein, L. Doucette-Stamm, K. C. Gunsalus, J. W. Harper, M. E. Cusick, F. P. Roth, D. E. Hill, and M. Vidal. 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**:540–543.
16. Marston, A. L., H. B. Thomaidis, D. H. Edwards, M. E. Sharpe, and J. Errington. 1998. Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev.* **12**:3419–3430.
17. Raskin, D. M., and P. A. de Boer. 1999. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:4971–4976.
18. Schroeder, B. K., B. L. House, M. W. Mortimer, S. N. Yurgel, S. C. Maloney, K. L. Ward, and M. L. Kahn. 2005. Development of a functional genomics platform for *Sinorhizobium meliloti*: construction of an ORFeome. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5858–5864.
19. Shapiro, L., H. H. McAdams, and R. Losick. 2002. Generating and exploiting polarity in bacteria. *Science* **298**:1942–1946.
20. Shih, Y. L., T. Le, and L. Rothfield. 2003. Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:7865–7870.
21. Van Driessche, B., L. Tafforeau, P. Hentges, A. M. Carr, and J. Vandenhaute. 2005. Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* **22**:1061–1068.
22. Van Mullem, V., M. Wery, X. De Bolle, and J. Vandenhaute. 2003. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**:739–746.
23. Walhout, A. J., G. F. Temple, M. A. Brasch, J. L. Hartley, M. A. Lorson, S. van den Heuvel, and M. Vidal. 2000. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **328**:575–592.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Description of the backbone vectors

Two different types of broad-host-range vectors were used in the present study. The first one, called pMR10*cat*, is a RK2*oriV*-based low copy plasmid derived from the pMR10 (Mohr and Roberts, unpublished). The second plasmids, pBBR1-MCS1 and pBBR1-MCS4 (12), are medium copy vectors derived from pBBR1 (1). The pMR10- and pBBR1-based vectors are mobilizable by RP4 and compatible with each other. We also used modified versions of pBluescript II SK or KS (Stratagene) in which RP4 *oriT* was inserted in order to make these vectors mobilizable. These plasmids use a ColE1 origin of replication which is inactive in α -proteobacteria and therefore can be used as suicide vectors at least in this bacterial class.

Construction of expression destination vectors

Destination vectors pRH001, pRH002 and pRH003 were obtained by cloning the GatewayTM cassette reading frame B (Invitrogen) into the unique *EcoRV* site of pMR10*cat*, pBBR1-MCS1 and pBBR1-MCS4, respectively (Table 1A). The orientation of the GatewayTM cassette in these 3 destination vectors was selected to ensure that ORFs were placed under the control of the *E. coli lac* promoter after LR reactions. The junctions of the new destination vectors were checked by sequencing.

Construction of fluorescence destination vectors

The *cfp* and *yfp* CDS were respectively excised from pFA6-CFP-NatMX6 and pFA6-YFP-NatMX6 (21) with *SmaI* and ligated into *EcoRV*-cut p*KSoriT* (see below) to give p*KSoriT*-*cfp* and p*KSoriT*-*yfp*. The GatewayTM cassette reading frame B was then cloned into *SmaI*-linearized p*KSoriT*-*cfp* and p*KSoriT*-*yfp* to give pRH007 and pRH008, respectively. Then GatewayTM cassette B in frame with *cfp* or *yfp* were transferred from pRH007 and pRH008 into pMR10*cat* by *XbaI*-*XhoI* digestion to respectively generate destination vectors pRH004 and pRH005. The pRH006 vector was constructed as follows: the *XhoI*-*NotI* fragment containing *egfp* was recovered from pEGFP-N2 (Clontech) and inserted into p*SKoriT* opened by *XhoI* and *NotI* to give p*SKoriT*-*egfp*. The GatewayTM cassette reading frame B was then introduced into the unique restriction site *SmaI* of p*SKoriT*-*egfp* which generated pRH009. Finally we obtained pRH006 by ligating the *SacI* fragment from pRH009 into the *SacI*-cut-pMR10*cat* in the same orientation as the *E. coli lac* promoter. For pRH010 to pRH012 constructs, *nptII* was excised from pUC4K (Pharmacia) by *SalI* digestion and subsequently cloned into *XhoI*-compatible site of pRH007 to pRH009, respectively. The junctions of the new destination vectors were checked by sequencing.

Construction of tagging destination vectors

GatewayTM cassette reading frame A fused to 3HA or GST were respectively recovered from pVV201 and pVV202 (22) by *EcoRV*-*XhoI* digestion and cloned into *EcoRV* and *XhoI* unique sites of pMR10*cat* to generate pRH013 and pRH014. pRH015 was obtained by inserting *XbaI*-*SpeI* fragment from pVV203 (22) into a *XbaI*-*SpeI*-cut pMR10*cat*. The pBBR1-MCS1-derived pRH016 and pRH017 were constructed by cloning the *HindIII*-*EcoRV* fragments from pVV201 and pVV202 into a pBBR1-MCS1 digested by *HindIII*-*EcoRV*. The GatewayTM cassette reading frame A fused to 13MYC was recovered by *BglII*-*SpeI* digestion of pVV203 and ligated into *BamHI*-*SpeI*-cut pBBR1-MCS1 to generate pRH018. Finally, pRH019 and pRH020 were obtained by ligating the *HindIII*-*EcoRV* fragment recovered from pVV201 and pVV202 into *HindIII*-*EcoRV*-cut p*SKoriTcat*. The junctions of the new destination vectors were checked by sequencing.

II. Matériels et Méthodes supplémentaires

Clonage Gateway

Amplification PCR

Les amorces en amont et en aval du fragment d'ADN d'intérêt à amplifier comportent à leur extrémité 5' respectivement les séquences spécifiques *attB1* (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA) et *attB2* (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA). Ces sites servent à la recombinaison dépendante de la BP clonase. Cent pmoles de ces amorces sont utilisées lors de la PCR en présence de 0,4 mM de dNTP, 5 µl de tampon de DNA polymérase concentré 10X, 1 µl de DNA polymérase (1U/µl, Roche) et de 10-100 ng d'ADN génomique, le tout dans un volume final de 50 µl. Le programme PCR est le suivant : 4 minutes à 94°C, 30 cycles comprenant 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 52°C et n minutes à 72°C (n représentant le nombre de kb à amplifier), et finalement 10 minutes à 72°C. Après vérification de l'efficacité et de la spécificité de la PCR sur gel d'agarose, les produits PCR pourront être utilisés pour la réaction BP.

Réaction BP

- Mélanger dans un tube PCR : 1 µl de BP clonase, 2 µl de tampon BP concentré 5X, 3 µl de produits PCR, 1 µl de pDONR201 linéarisé par *NcoI* (150 ng/µl) et 3 µl d'eau distillée.
- Incuber à 25°C de 1 à 24 h.
- Ajouter 2 µl de solution de Protéinase K et incuber à 37°C pendant 10 minutes.
- Electroporer 2 µl de cette réaction dans une souche de *E. coli* sensible à CcdB, par exemple DH10B et sélectionner les transformants sur des boîtes LB contenant de la kanamycine à une concentration de 50 µg/ml.

Réaction LR

- Mélanger dans un tube PCR : 1 µl de LR clonase, 2 µl de tampon LR concentré 5X, 3 µl du clone d'entrée généré suite à la réaction BP (150 ng), 1 µl de vecteur de destination linéarisé si possible par *NcoI* (150 ng/µl) et 3 µl d'eau distillée.
- Incuber à 25°C de 1 à 24 h.
- Electroporer 2 µl de cette réaction dans une souche de *E. coli* sensible à CcdB, par exemple DH10B et sélectionner les transformants sur des boîtes LB contenant l'antibiotique correspondant au marqueur de résistance porté par le vecteur de destination.

Préparation échantillons pour la microscopie à fluorescence

- Inoculer une culture de la souche exprimant la fusion entre votre protéine d'intérêt et une protéine fluorescente avec les antibiotiques adéquats et incuber ces cultures overnight à 37°C.
- Diluer la culture le lendemain et incuber à 37°C jusqu'en milieu de phase exponentielle.
- Le jour J, chauffer le mélange VALAP (Vaseline, Lanoline, Paraffine 1:1:1) dans le bain à 80°C et allumer le microscope et la lampe à vapeur de mercure
- Préparer les agarose pad : Dissoudre de l'agarose à une concentration de 1% dans du PBS 1X si prise unique d'images ou dans du 2YT si expérience de time-lapse. Placer 800 μ l de ces solutions sur une lame de verre et apposer une seconde lame par dessus. Une fois l'agarose solidifié, retirer délicatement l'une des deux lames de verre en les faisant glisser l'une sur l'autre.
- Placer 1 μ l de la culture jusqu'en milieu de phase exponentielle.
- Apposer une lamelle couvre-objet, couper l'agarose pad qui dépasse de la lamelle et sceller le contour de la lamelle avec le VALAP.
- Laver délicatement les lames à l'éthanol.
- Rechercher les bactéries en DIC et une fois trouvées, effectuer un réglage de Kohler.
- Prendre une image DIC sans gain avec un temps d'exposition de 50-80 msec
- Retirer l'analyseur, éteindre la lampe, sélectionner le cube de fluorescence désiré et appliquer un gain si nécessaire (pour les faibles signaux).
- Prendre une image FLUO sans gain avec un temps d'exposition de 1-1,5 sec (gain de 20-100 si faibles signaux).
- Pour les expériences de time-lapse, les prises d'images DIC et FLUO se dérouleront à intervalles de temps réguliers.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler, H.I., Fisher, W.D., Cohen, A. and Hardigree, A.A. (1967) MINIATURE escherichia coli CELLS DEFICIENT IN DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **57**, 321-326.
- Ausmees, N. and Jacobs-Wagner, C. (2003) Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol*, **57**, 225-247.
- Bai, U., Mandic-Mulec, I. and Smith, I. (1993) SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. *Genes Dev*, **7**, 139-148.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J.J. and De Bolle, X. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol*, **43**, 945-960.
- Ben-Yehuda, S. and Losick, R. (2002) Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*, **109**, 257-266.
- Bernhardt, T.G. and de Boer, P.A. (2003) The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol*, **48**, 1171-1182.
- Bernhardt, T.G. and de Boer, P.A. (2004) Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Mol Microbiol*, **52**, 1255-1269.
- Bernhardt, T.G. and de Boer, P.A. (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell*, **18**, 555-564.
- Biondi, E.G., Reisinger, S.J., Skerker, J.M., Arif, M., Perchuk, B.S., Ryan, K.R. and Laub, M.T. (2006) Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature*, **444**, 899-904.
- Bork, P., Sander, C. and Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7290-7294.
- Britton, R.A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossman, A.D. (2002) Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **184**, 4881-4890.
- Burton, G.J., Hecht, G.B. and Newton, A. (1997) Roles of the histidine protein kinase pleC in *Caulobacter crescentus* motility and chemotaxis. *J Bacteriol*, **179**, 5849-5853.
- Cabeen, M.T. and Jacobs-Wagner, C. (2005) Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 601-610.
- Cervin, M.A., Lewis, R.J., Brannigan, J.A. and Spiegelman, G.B. (1998a) The *Bacillus subtilis* regulator SinR inhibits spoIIIG promoter transcription in vitro without displacing RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3806-3812.
- Cervin, M.A., Spiegelman, G.B., Raether, B., Ohlsen, K., Perego, M. and Hoch, J.A. (1998b) A negative regulator linking chromosome segregation to developmental transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **29**, 85-95.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. and Godfroid, J. (2001) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect*, **3**, 729-738.

- Core, L. and Perego, M. (2003) TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **49**, 1509-1522.
- Dai, K. and Lutkenhaus, J. (1992) The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 6145-6151.
- de Boer, P., Crossley, R. and Rothfield, L. (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, **359**, 254-256.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Holtje, J.V. and Schwarz, H. (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 2823-2834.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mijer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N. and Overbeek, R. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 443-448.
- Dewar, S.J., Begg, K.J. and Donachie, W.D. (1992) Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *J Bacteriol*, **174**, 6314-6316.
- Domian, I.J., Quon, K.C. and Shapiro, L. (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell*, **90**, 415-424.
- Domian, I.J., Reisenauer, A. and Shapiro, L. (1999) Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6648-6653.
- Dworkin, J. and Losick, R. (2001) Differential gene expression governed by chromosomal spatial asymmetry. *Cell*, **107**, 339-346.
- Edwards, D.H. and Errington, J. (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol*, **24**, 905-915.
- England, J.C. and Gober, J.W. (2001) Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 674-680.
- Errington, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*, **1**, 117-126.
- Errington, J., Daniel, R.A. and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 52-65, table of contents.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. and Youngman, P. (2000) The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8063-8068.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferrooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. and Letesson, J.J. (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol*, **7**, 687-698.
- Gitai, Z., Thanbichler, M. and Shapiro, L. (2005) The choreographed dynamics of bacterial chromosomes. *Trends Microbiol*, **13**, 221-228.
- Glaser, P., Sharpe, M.E., Raether, B., Perego, M., Ohlsen, K. and Errington, J. (1997) Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev*, **11**, 1160-1168.
- Goffin, C. and Ghuysen, J.M. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1079-1093.
- Gorvel, J.P. and Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, **90**, 281-297.

- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. and Jenal, U. (2001) Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4681-4686.
- Hale, C.A. and de Boer, P.A. (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell*, **88**, 175-185.
- Hale, C.A. and de Boer, P.A. (1999) Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol*, **181**, 167-176.
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J. and De Bolle, X. (2004) Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol*, **12**, 361-365.
- Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P. and Olsen, S.C. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol*, **187**, 2715-2726.
- Hecht, G.B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J.M. and Newton, A. (1995) An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J*, **14**, 3915-3924.
- Hecht, G.B. and Newton, A. (1995) Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **177**, 6223-6229.
- Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (1995) *Two-Component Signal Transduction*. ASM Press, Washington DC.
- Hoch, J.A. and Varughese, K.I. (2001) Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol*, **183**, 4941-4949.
- Holtzendorff, J., Hung, D., Brede, P., Reisenauer, A., Viollier, P.H., McAdams, H.H. and Shapiro, L. (2004) Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science*, **304**, 983-987.
- Huguenel, E.D. and Newton, A. (1982) Localization of surface structures during procaryotic differentiation: role of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Differentiation*, **21**, 71-78.
- Hung, D.Y. and Shapiro, L. (2002) A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13160-13165.
- Iniesta, A.A., McGrath, P.T., Reisenauer, A., McAdams, H.H. and Shapiro, L. (2006) A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10935-10940.
- Ishikawa, S., Core, L. and Perego, M. (2002) Biochemical characterization of aspartyl phosphate phosphatase interaction with a phosphorylated response regulator and its inhibition by a pentapeptide. *J Biol Chem*, **277**, 20483-20489.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S.J., Shapiro, L. and Laub, M.T. (2003) Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol Microbiol*, **47**, 1279-1290.
- Jacobs, C., Domian, I.J., Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell*, **97**, 111-120.
- Jacobs, C., Hung, D. and Shapiro, L. (2001) Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4095-4100.
- Jacobs-Wagner, C. (2004) Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol Microbiol*, **51**, 7-13.

- Janakiraman, R.S. and Brun, Y.V. (1999) Cell cycle control of a holdfast attachment gene in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **181**, 1118-1125.
- Jenal, U. and Fuchs, T. (1998) An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J*, **17**, 5658-5669.
- Judd, E.M., Ryan, K.R., Moerner, W.E., Shapiro, L. and McAdams, H.H. (2003) Fluorescence bleaching reveals asymmetric compartment formation prior to cell division in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8235-8240.
- Keiler, K.C. and Shapiro, L. (2003a) tmRNA in *Caulobacter crescentus* is cell cycle regulated by temporally controlled transcription and RNA degradation. *J Bacteriol*, **185**, 1825-1830.
- Keiler, K.C. and Shapiro, L. (2003b) TmRNA is required for correct timing of DNA replication in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **185**, 573-580.
- Keiler, K.C., Waller, P.R. and Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, **271**, 990-993.
- Lam, H., Matroule, J.Y. and Jacobs-Wagner, C. (2003) The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell*, **5**, 149-159.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L. and McAdams, H.H. (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4632-4637.
- Laub, M.T., McAdams, H.H., Feldblyum, T., Fraser, C.M. and Shapiro, L. (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*, **290**, 2144-2148.
- Lin, D.C. and Grossman, A.D. (1998) Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell*, **92**, 675-685.
- Liu, Z., Mukherjee, A. and Lutkenhaus, J. (1999) Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol Microbiol*, **31**, 1853-1861.
- Lutkenhaus, J. and Mukherjee, A. (1996) Cell division. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, 2nd edn. ASM Press, Washington D.C., Vol. 2, p. 1615-1626.
- Ma, X. and Margolin, W. (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol*, **181**, 7531-7544.
- Marczynski, G.T., Lentine, K. and Shapiro, L. (1995) A developmentally regulated chromosomal origin of replication uses essential transcription elements. *Genes Dev*, **9**, 1543-1557.
- Marczynski, G.T. and Shapiro, L. (1992) Cell-cycle control of a cloned chromosomal origin of replication from *Caulobacter crescentus*. *J Mol Biol*, **226**, 959-977.
- Marston, A.L. and Errington, J. (1999) Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell*, **4**, 673-682.
- Marston, A.L., Thomaides, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E. and Errington, J. (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev*, **12**, 3419-3430.
- Martin, M.E., Trimble, M.J. and Brun, Y.V. (2004) Cell cycle-dependent abundance, stability and localization of FtsA and FtsQ in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, **54**, 60-74.
- Matroule, J.Y., Lam, H., Burnette, D.T. and Jacobs-Wagner, C. (2004) Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell*, **118**, 579-590.

- McAdams, H.H., Srinivasan, B. and Arkin, A.P. (2004) The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nat Rev Genet*, **5**, 169-178.
- McGrath, P.T., Iniesta, A.A., Ryan, K.R., Shapiro, L. and McAdams, H.H. (2006) A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell*, **124**, 535-547.
- Mitchison, J. (1971) *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, London.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S. and Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **50**, 1683-1701.
- Mulder, E. and Woldringh, C.L. (1989) Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J Bacteriol*, **171**, 4303-4314.
- Ohta, N., Grebe, T.W. and Newton, A. (2000) Signal transduction and cell cycle checkpoints in developmental regulation of *Caulobacter*. In Brun, Y.V. and Shimkets, L.J. (eds.), *In Prokaryotic Development*, ASM Press, Washington, D.C, p. 341-359.
- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E.G., Sommer, J.M. and Newton, A. (1992) A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10297-10301.
- Ohta, N. and Newton, A. (2003) The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol*, **185**, 4424-4431.
- Osley, M.A. and Newton, A. (1980) Temporal control of the cell cycle in *Caulobacter crescentus*: roles of DNA chain elongation and completion. *J Mol Biol*, **138**, 109-128.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev*, **18**, 715-727.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M. and Fraser, C.M. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13148-13153.
- Perego, M. (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol*, **6**, 366-370.
- Perego, M. (2001) A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **42**, 133-143.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *Embo J*, **21**, 685-693.
- Piggot, P.J. and Hilbert, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 579-586.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, **66**, 5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Gorvel, J.P. (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect*, **2**, 829-835.
- Quardokus, E.M. and Brun, Y.V. (2002) DNA replication initiation is required for mid-cell positioning of FtsZ rings in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, **45**, 605-616.

- Quardokus, E.M., Din, N. and Brun, Y.V. (2001) Cell cycle and positional constraints on FtsZ localization and the initiation of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, **39**, 949-959.
- Quisel, J.D. and Grossman, A.D. (2000) Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J Bacteriol*, **182**, 3446-3451.
- Quisel, J.D., Lin, D.C. and Grossman, A.D. (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, **4**, 665-672.
- Quon, K.C., Marczynski, G.T. and Shapiro, L. (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, **84**, 83-93.
- Quon, K.C., Yang, B., Domian, I.J., Shapiro, L. and Marczynski, G.T. (1998) Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 120-125.
- Raskin, D.M. and de Boer, P.A. (1997) The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell*, **91**, 685-694.
- Raskin, D.M. and de Boer, P.A. (1999a) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 6419-6424.
- Raskin, D.M. and de Boer, P.A. (1999b) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4971-4976.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serron, P., Wong, K.W. and Sonenshein, A.L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev*, **15**, 1093-1103.
- Reisenauer, A. and Shapiro, L. (2002) DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *Embo J*, **21**, 4969-4977.
- Rothfield, L., Taghbalout, A. and Shih, Y.L. (2005) Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 959-968.
- Rowland, S.L., Burkholder, W.F., Cunningham, K.A., Maciejewski, M.W., Grossman, A.D. and King, G.F. (2004) Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell*, **13**, 689-701.
- Ryan, K.R., Judd, E.M. and Shapiro, L. (2002) The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J Mol Biol*, **324**, 443-455.
- Sackett, M.J., Kelly, A.J. and Brun, Y.V. (1998) Ordered expression of ftsQA and ftsZ during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *Mol Microbiol*, **28**, 421-434.
- Sciochetti, S.A., Lane, T., Ohta, N. and Newton, A. (2002) Protein sequences and cellular factors required for polar localization of a histidine kinase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **184**, 6037-6049.
- Sciochetti, S.A., Ohta, N. and Newton, A. (2005) The role of polar localization in the function of an essential *Caulobacter crescentus* tyrosine kinase. *Mol Microbiol*, **56**, 1467-1480.
- Scott, D.J., Leejeerajumnean, S., Brannigan, J.A., Lewis, R.J., Wilkinson, A.J. and Hoggett, J.G. (1999) Quaternary re-arrangement analysed by spectral enhancement: the interaction of a sporulation repressor with its antagonist. *J Mol Biol*, **293**, 997-1004.
- Siam, R. and Marczynski, G.T. (2003) Glutamate at the phosphorylation site of response regulator CtrA provides essential activities without increasing DNA binding. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1775-1779.
- Skerker, J.M. and Laub, M.T. (2004) Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 325-337.

- Sommer, J.M. and Newton, A. (1989) Turning off flagellum rotation requires the pleiotropic gene pleD: pleA, pleC, and pleD define two morphogenic pathways in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **171**, 392-401.
- Sommer, J.M. and Newton, A. (1991) Pseudoreversion analysis indicates a direct role of cell division genes in polar morphogenesis and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Genetics*, **129**, 623-630.
- Sonenshein, A.L. (2000) Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 561-566.
- Spratt, B.G. (1977) Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, **131**, 293-305.
- Stephenson, K. and Hoch, J.A. (2001) PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15251-15256.
- Stewart, E.J., Madden, R., Paul, G. and Taddei, F. (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol*, **3**, e45.
- Thanbichler, M. and Shapiro, L. (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*, **126**, 147-162.
- Thomaides, H.B., Freeman, M., El Karoui, M. and Errington, J. (2001) Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev*, **15**, 1662-1673.
- Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H. and Shapiro, L. (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9257-9262.
- Wang, S.P., Sharma, P.L., Schoenlein, P.V. and Ely, B. (1993) A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 630-634.
- Weir, J., Predich, M., Dubnau, E., Nair, G. and Smith, I. (1991) Regulation of spo0H, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor. *J Bacteriol*, **173**, 521-529.
- Weiss, D.S. (2004) Bacterial cell division and the septal ring. *Mol Microbiol*, **54**, 588-597.
- Wheeler, R.T. and Shapiro, L. (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell*, **4**, 683-694.
- Wu, J., Ohta, N. and Newton, A. (1998a) An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1443-1448.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J.L. and Newton, A. (1999) A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13068-13073.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **49**, 1463-1475.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **117**, 915-925.
- Wu, L.J., Feucht, A. and Errington, J. (1998b) Prespore-specific gene expression in *Bacillus subtilis* is driven by sequestration of SpoIIE phosphatase to the prespore side of the asymmetric septum. *Genes Dev*, **12**, 1371-1380.